

ANNALES  
DE L'INSTITUT PASTEUR

---

SCEAUX. — IMPRIMERIE E. CHARAIRE

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

**M. E. DUCLAUX**

MEMBRE DE L'INSTITUT  
PROFESSEUR A LA SORBONNE  
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. **CHAMBERLAND**, chef de service à l'Institut Pasteur;  
**D<sup>r</sup> GRANCHER**, professeur à la Faculté de médecine;  
**METCHNIKOFF**, chef de service à l'Institut Pasteur;  
**NOCARD**, professeur à l'École vétérinaire d'Alfort;  
**D<sup>r</sup> ROUX**, sous-directeur de l'Institut Pasteur;  
**D<sup>r</sup> VAILLARD**, professeur au Val-de-Grâce.

TOME ONZIÈME

1897

AVÉC VINGT-DEUX PLANCHES

PARIS

MASSON ET C<sup>ié</sup>, ÉDITEURS  
LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MÉDECINE  
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN



ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR UNE MOISISSURE NOUVELLE

L'EUROTIOPSIS GAYONI

PAR M. J. LABORDE

Travail fait au Laboratoire de Microbiologie de M. Gayon,  
à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

L'étude des phénomènes d'ordre chimique et physiologique produits par la vie des êtres microscopiques acquiert tous les jours une importance plus considérable, depuis que Pasteur a montré que la nutrition des infinitésimement petits est soumise aux mêmes exigences et aux mêmes lois que celle des êtres supérieurs.

Les phénomènes physico-chimiques dont le protoplasma des cellules est le siège nous sont encore peu connus, car nous ne les observons guère qu'à l'extérieur de la cellule, dans le milieu ambiant. Il en est pourtant qui permettent de pénétrer assez avant dans le mécanisme de la nutrition intracellulaire. Ainsi, par exemple, les actions des diastases.

On connaît un nombre important de ces transformations diastasiques : mais le peu qu'on sait sur elles est épars dans la littérature scientifique et résulte de travaux faits avec des organismes très divers.

J'ai eu occasion de rencontrer une mucédinée qui présente à elle seule comme une sorte de synthèse : soit comme agent producteur de diastase, soit comme agent transformateur de la matière alimentaire, elle jouit d'aptitudes très diverses.

Elle m'a paru, étudiée à ce point de vue, devoir fournir un type intéressant.

Elle a été rencontrée sur de l'empois d'amidon abandonné à lui-même, où sa présence se manifeste par des taches de couleur rouge sang plus ou moins pourprée, pouvant être considérées, au premier aspect, comme produites par le *micrococcus prodigiosus*. Mais, à l'examen microscopique, on découvre un mycélium coloré en rouge, sillonnant en tous sens la masse de l'empois, lui-même coloré par le pigment sécrété par ce mycélium. A un âge plus avancé, ces taches portent un très léger feutrage aérien constitué par des organes de reproduction. On est donc en présence d'une moisissure; je l'ai isolée, et j'ai entrepris son étude au point de vue physiologique.

Elle a été envoyée à M. Costantin qui a bien voulu en faire l'étude botanique, et qui, dans la note qu'il a publiée<sup>1</sup>, a proposé de lui donner le nom d'*Eurotiopsis Gayoni*, genre nouveau d'Ascomycètes, espèce nouvelle, qui se développe en général sous sa forme parfaite, comportant des périthèces et des conidies.

## PREMIÈRE PARTIE

### Alimentation générale de la plante.

#### I. — MILIEUX DE CULTURE.

*L'Eurotiopsis Gayoni* peut se développer sur la plupart des milieux naturels où l'on voit apparaître les moisissures vulgaires: *penicillium*, *aspergillus*, *mucors*, etc.; cependant il est assez rare. Ses fonctions physiologiques le mettent, en effet, dans un état d'infériorité marquée dans la lutte pour l'existence qui se produit toujours entre divers champignons tombant dans un même milieu de culture. On peut cependant le cultiver facilement.

Quand on remplace le sucre candi du liquide Raulin par le sucre interverti, et que ce liquide est réparti sur le fond d'un grand matras Duclaux fermé par un tampon d'ouate peu serré,

1. *Eurotiopsis*, nouveau genre d'Ascomycètes. (*Bulletin de la Société botanique de France*.)

sous une épaisseur de quelques millimètres seulement, on a, après stérilisation, un milieu qui, maintenu à la température de 28°, remplit les conditions physiques que j'ai reconnues être convenables à un développement vigoureux de l'*Eurotiopsis*.

Le sucre est épuisé complètement en cinq ou six jours, et le poids de récolte obtenu, dans ces conditions, avec 200 c. c. de liquide contenant 10 grammes de sucre interverti, est constant et égal à 3 gr. 3, d'où un rendement de 35 0/0 du sucre consommé, soit en moyenne, 5,8 0/0 par jour, rendement qui est sensiblement plus élevé que celui qu'a obtenu M. Raulin dans le même temps, pour l'*Aspergillus niger*, dans les conditions qu'il a indiquées<sup>1</sup>, et qui est de 30,5 0/0, en calculant en sucre interverti le poids de saccharose utilisé.

Par conséquent, le liquide Raulin permet d'obtenir, avec l'*Eurotiopsis*, une végétation suffisamment intense pour l'étude de son alimentation hydrocarbonée. Cependant on peut se demander si, en modifiant convenablement l'aliment azoté, on n'arriverait pas à éléver davantage le rendement: c'est ce que nous allons examiner maintenant.

## II. — ALIMENTATION AZOTÉE.

L'azote peut être mis à la disposition des moisissures sous la forme inorganique ou organique; dans le premier cas, on peut distinguer deux formes de combinaisons assimilables, l'azote nitrique et l'azote ammoniacal; dans le second entrent un grand nombre de composés qui peuvent fournir de l'azote aux champignons, mais les plus intéressants sont les matières albuminoïdes.

Dans les expériences faites pour étudier la valeur nutritive des divers composés azotés minéraux ou organiques qui vont être énumérés plus loin, les liquides de culture avaient la composition générale suivante :

Eau.....	200 c. c.
Sucre interverti.....	10gr, 00
Azote.....	0gr, 20
Acide tartrique.....	0gr, 50

1. Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une mucédinée dans un milieu artificiel. (*Annales des Sciences naturelles*, 1869.)

Tartrate neutre de potasse.....	Ogr, 43
Phosphate de magnésie.....	Ogr, 20
Acide sulfurique.....	Ogr, 02
Sulfate de fer et sulfate de zinc.....	
Silicate de potasse.....	traces.

Les conditions physiques de culture ont été indiquées ci-dessus pour la culture sur liquide Raulin en sucre interverti, faite en même temps et servant de témoin.

Le tableau suivant indique : 1<sup>o</sup> la durée de la culture ; 2<sup>o</sup> le poids de la récolte séchée à 100<sup>o</sup> ; 3<sup>o</sup> le rendement moyen par jour ; 4<sup>o</sup> l'acidité, au moment de la récolte, du liquide de culture ramené à son volume primitif de 200 c. c. avec les eaux de lavage de la moisissure.

MATIÈRES AZOTÉES	DURÉE des cultures en jours.	POIDS des récoltes. gr.	RENDEMENT par jour.	ACIDITÉ du liquide par litre.
AZOTE INORGANIQUE	Témoin.....	6	3.50	5.8
	Nitrate d'ammoniaque.....	6	3.56	5.9
	Nitrate de soude ou de potasse.....	11	3.40	3.1
	Tartrate d'ammoniaque .....	10	3.40	3.4
	Phosphate —	12	3.02	2.5
	Sulfate —	12	2.80	2.3
	Chlorhydrate —	16	2.70	1.7
AZOTE ORGANIQUE	Eau de levure.....	8	3.90	4.9
	Asparagine .....	8	3.60	4.5
	Caséine.....	9	3.95	4.4
	Gluten.....	9	3.76	4.2
	Urée.....	9	3.64	4.2
	Gélatine.....	9	3.60	4.0
	Fibrine.....	10	3.60	3.6
	Peptone.....	12	3.70	3.1
	Albumine de sang.....	14	3.60	2.6
	Albumine de l'œuf.....	14	3.00	2.4

Les chiffres de la quatrième colonne du tableau établissent entre les divers aliments azotés des différences bien plus importantes que ceux de la 3<sup>e</sup>: ils montrent que la plante préfère de beaucoup le nitrate d'ammoniaque à toute autre forme de combinaison de l'azote. Il est difficile de savoir si l'azote nitrique convient mieux que l'azote ammoniacal d'après les résultats obtenus avec les nitrates de potasse ou de soude et le tartrate d'ammoniaque. Pour les autres sels ammoniacaux, l'infériorité du rendement s'explique par les variations survenues dans l'acidité du liquide de culture.

Cette acidité était, au moment de l'ensemencement, de 2 gr. 6 par litre environ (exprimée en acide tartrique) pour tous les liquides, sauf pour le témoin et le liquide au phosphate d'ammoniaque, pour lesquels l'acidité correspondait à 3 gr. 0 et 5 gr. 2 d'acide tartrique, dosée avec la phénol-phthaléine comme indicateur.

Avec ces données, si on examine les chiffres de la cinquième colonne du tableau, on voit que l'acidité a augmenté considérablement avec les sels ammoniacaux, tandis qu'elle a diminué, plus ou moins, avec les nitrates. Il est évident que, pour assimiler l'ammoniaque, la plante a décomposé le sel et mis l'acide en liberté; et, suivant la nature et la quantité de cet acide, la végétation était plus ou moins entravée.

C'est pour cette raison qu'on a été conduit à réduire à 0,05 0/0 la quantité d'azote mise à la disposition de la plante, de façon à éviter une trop forte proportion d'acide mis en liberté. Avec la dose de 0,1 0/0, en effet, on a vu l'acidité s'élever à plus de 6 grammes par litre pour le sulfate et le chlorhydrate, tandis que le poids de plante produite était plus faible (2 gr. 5 au lieu de 2,8), bien que la quantité d'azote assimilé fût plus grande. Il restait encore une forte proportion de sucre non utilisé, même après un contact prolongé du liquide avec la moisissure.

Avec le phosphate d'ammoniaque, à la dose de 0,1 0/0 d'azote, le développement devenait presque impossible, car l'acidité initiale, due à ce sel, était voisine de celle qui arrête le développement de la plante lorsqu'elle le décompose.

L'augmentation de l'acidité se produit très rapidement au commencement de la végétation; c'est donc à ce moment que l'assimilation de l'azote paraît être maximum, et l'on peut remarquer, d'après les résultats obtenus avec les sels ammoniacaux, que la quantité d'azote nécessaire pour faire développer un certain poids de plante n'est pas toujours la même.

Si on laisse vieillir la plante dans le milieu qui lui a donné naissance, la réaction acide de ce milieu peut devenir alcaline, et, avec les nitrates à bases fixes, le liquide contient une quantité de carbonates alcalins assez grande pour donner une effervescence manifeste avec les acides.

Pour l'azote organique, certains chiffres de la 3<sup>e</sup> colonne sont assez supérieurs à celui du témoin; ils devraient subir tous une petite correction qui éliminerait l'influence de la matière azotée utilisée comme source de carbone. Mais pratiquement il est impossible de connaître ce terme de correction (le poids de plante obtenu sur un milieu constitué par les éléments minéraux et la matière azotée seule étant nul ou ne dépassant pas les erreurs d'expérience), sauf pour l'eau de levure qui contient des matières hydrocarbonées avec les matières azotées; aussi cette correction a-t-elle été faite dans ce cas seulement.

Le rendement est plus élevé pour l'eau de levure que pour

toutes les autres sources d'azote organique, peut-être parce que l'azote qu'elle contient, ayant déjà fait partie d'un protoplasma de constitution chimique analogue, est encore très apte à constituer celui de la plante.

La résistance à l'assimilation augmente lentement et régulièrement, depuis la caséine qui convient le mieux, jusqu'aux albumines de l'œuf et du sang qui sont particulièrement difficiles à consommer par la moisissure ; elle n'établit pas de différences bien importantes entre certaines matières albuminoïdes et l'asparagine ou l'urée qui se rapprochent plutôt des sels ammoniacaux par leur composition chimique. La faiblesse du rendement obtenu avec la peptone est assez remarquable ; il semble en effet que la peptone aurait dû fournir l'azote plus rapidement que la fibrine.

En somme, l'expérience qui précède montre que l'*Eurotiopsis* peut emprunter l'azote à un assez grand nombre de sources minérales et organiques, en donnant un rendement final au moins égal à celui que l'on obtient avec l'*Aspergillus niger* vivant sur son milieu type, dans les conditions indiquées par M. Raulin. Mais si on calcule le rendement moyen par jour de culture, on trouve que, de toutes ces sources azotées de la plante, le nitrate d'ammoniaque est celle qui donne le chiffre le plus élevé.

### III. — ALIMENTATION HYDROCARBONÉE.

Dans l'étude de l'alimentation hydrocarbonée de l'*Eurotiopsis*, on constitue, avec chaque aliment, un milieu de culture dont on connaît déjà la composition minérale et azotée, et qui présente, en général, les conditions physiques suivantes :

On aura 800 c. c. de liquide formant une couche de 2 centimètres environ sur le fond d'un grand matras Duclaux, maintenu à l'étuve à 30 ou 32°, le col du matras étant fermé par un bouchon portant un tube à entonnoir garni d'ouate, et un siphon permettant de faire des prises de liquide, ou bien de renouveler l'atmosphère intérieure par aspiration à l'aide de la trompe à eau. Les milieux de culture seront toujours stérilisés avant d'êtreensemencés, et renfermeront en général une proportion de 5 0/0 de l'aliment hydrocarboné.

*Amidon.* — Avec cette proportion d'amidon, on obtient un

empois presque solide donnant naissance, après ensemencement, à une sorte de pellicule lisse semblable à une membrane de parchemin qu'on aurait placée sur l'empois. La liquéfaction et la combustion de l'empois sont peu actives, car il faut plus d'un mois pour faire disparaître à peu près complètement l'amidon.

Cette forme du développement de la plante est assez anormale : elle indique un certain état de gêne que l'on peut faire disparaître en diminuant de moitié l'acidité du milieu de culture. La végétation est alors beaucoup plus vigoureuse : elle comporte des tubes aériens formant un feutrage de plus en plus épais. L'empois est liquéfié et brûlé plus rapidement, mais, dans les deux cas, on ne constate la présence dans le liquide que de très petites quantités de sucre réducteur et de dextrine, 0,2 à 0,3 0/0 au maximum. Le pouvoir comburant est donc voisin du pouvoir saccharifiant. La saccharification est due à une action diastasique, manifestable en dehors de la vie de la plante, avec son liquide de culture et son liquide cellulaire, dans les conditions suivantes :

1<sup>o</sup> A 75 c. c. de liquide de culture, on a ajouté 23 c. c. d'empois d'amidon à 10 0/0 et 1 c. c. d'une solution alcoolique de thymol au 1/10.

2<sup>o</sup> A 10 gr. de la moisissure fraîche (correspondant à 2 gr. environ de matière sèche) triturés finement dans un mortier avec du sable, on a ajouté 100 c. c. d'empois d'amidon à 4 0/0 et 4 c. c. de thymol.

Deux mélanges identiques ont été chauffés à 400° pour servir de témoins ; le tout a été mis ensuite à l'étuve à 50° pendant 36 heures.

L'analyse des liquides a donné ensuite les résultats suivants :

	Rotation observée,	Glucose. 0/0	Dextrine. 0/0	Rotation calculée.
	div. sacch.	gr.	gr.	div. sacch.
1 <sup>o</sup> Liquide de culture....	+ 15	1.72	0.33	+ 14.9
2 <sup>o</sup> Liquide cellulaire....	+ 20.5	2.50	0.45	+ 21.0

L'action diastasique, très énergique dans ces deux cas, ne s'était pas produite dans les témoins. Les résultats de l'analyse ont été calculés dans l'hypothèse d'un mélange de glucose et de dextrine comme produits de la réaction, hypothèse qui est vérifiée par la concordance entre la rotation calculée et la rotation observée.

M. Duclaux a montré que l'*Aspergillus niger*, arrivé à maturité, peut utiliser l'amidon cru comme aliment; il le transforme d'abord en glucose qui est ensuite brûlé avec formation intérieure d'acide oxalique, absolument comme l'amidon gélatineux. L'*Eurotiopsis* jouit de la même propriété, sauf la production d'acide oxalique que l'on ne retrouve dans aucun cas. Il est difficile de savoir s'il peut utiliser l'amidon cru au moment de la germination des spores, à cause de la difficulté de stériliser le milieu en conservant intact le grain d'amidon.

*Dextrine.* — Avec la dextrine, on a un milieu de culture liquide dans lequel on peut suivre avec facilité les transformations de la matière hydrocarbonée pendant qu'elle est consommée par la plante. La végétation est très prospère: la couche de moisissure qui se forme est plus ou moins teintée de jaune orangé, ondulée, avec un aspect cotonneux qui tient à un feutrage épais d'organes de reproduction.

L'analyse des prises successives faites dans le liquide de culture a donné les chiffres suivants :

	Rotation observée.	Glucose. 0/0	Dextrine. 0/0	Rotation calculée.
	—	—	—	—
	div. sacch.	gr.	gr.	div. sacch.
Liquide primitif.....	+ 405	traces.	5.30	106.0
1 <sup>er</sup> essai.....	+ 64	4.31	3.00	66.2
2 <sup>e</sup> — .....	+ 38	2.90	1.17	37.4
3 <sup>e</sup> — .....	+ 14	1.30	0.40	14.3

La provision de glucose formé est ici bien plus importante qu'avec l'empois d'amidon, et elle est évidemment le produit d'une action diastasique, qui s'exerce aussi bien sur l'empois d'amidon que sur la dextrine dans les conditions indiquées ci-dessus; le sucre formé est toujours du glucose.

*Maltose.* — On admet généralement que le maltose n'est assimilé par une cellule vivante qu'à la condition d'être préalablement transformé en glucose à l'aide d'une diastase produite par cette cellule.

Des expériences nombreuses ont été faites avec les liquides de l'organisme; certains d'entre eux ont la propriété de dédoubler le maltose en glucose, propriété indiquée d'une façon très nette

pour le sang et pour l'urine par M. Dubourg<sup>1</sup>. La même propriété, reconnue aux cellules de l'*Aspergillus niger* et du *Penicillium glaucum* par M. Bourquelot<sup>2</sup>, paraît appartenir aussi à la levure de bière, d'après les expériences de ce savant et celles plus récentes de M. Fischer<sup>3</sup>.

Quand on alimente l'*Eurotiopsis* avec du maltose, et qu'on suit la disparition du sucre dans le liquide de culture, on trouve que le maltose est constamment seul depuis le commencement jusqu'vers la fin de sa consommation. A ce moment, l'analyse paraît indiquer qu'une petite proportion de glucose est mélangée au maltose. Ce résultat étant insuffisant pour démontrer que le maltose est dédoublé en glucose avant d'être assimilé par la plante, on a fait l'expérience suivante :

On a pris deux cultures parallèles sur maltose, et on les a arrêtées la 1<sup>re</sup> lorsqu'il restait encore le 1/3 de la proportion initiale du sucre, la 2<sup>e</sup> après sa disparition complète. On a cherché ensuite pour toutes les deux, toutes choses égales d'ailleurs, suivant la méthode employée précédemment, quelle était l'importance de l'action diastasique sur le maltose que pouvaient produire le liquide de culture et le liquide cellulaire de la plante.

On a obtenu les résultats suivants :

		Maltose dédoublé 0/0
Culture no 1	{ Liquide de culture.....	0.14
	{ Liquide cellulaire.....	1.34
Culture no 2	{ Liquide de culture.....	1.22
	{ Liquide cellulaire.....	1.56

Le dédoublement a été presque nul dans le premier de ces liquides, tandis qu'il a été très important dans tous les autres. Il existe donc dans les cellules de la plante, depuis le début du développement jusqu'à la fin, une diastase qui dédouble le maltose en glucose, et qui, dans les conditions de culture que l'on connaît, ne se diffuse en quantité sensible dans le liquide nutritif que lorsque l'aliment hydrocarboné commence à faire défaut. Ce fait est tout à fait analogue à celui qui a été mis en lumière par

1. Recherches sur l'amylase de l'urine. (*Thèse pour le doctorat ès sciences, Paris, 1889.*)

2. Remarques sur les ferment solubles sécrétés par l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*. (*Société de biologie 1893.*)

3. Einfluss des Configurations auf die Wirkung der Enzyme. (*Ber d. d. chem. Gesellschaft, XXVII, 1894.*)

M. Fernbach<sup>1</sup> pour l'*Aspergillus niger* vivant sur le saccharose.

La diffusion diastasique, qui n'a lieu qu'à partir d'un âge assez avancé de la plante, paraît être un phénomène de désassimilation sur lequel nous reviendrons plus tard, et qui est influencé probablement par plusieurs causes, pour l'*Eurotiopsis* comme pour l'*Aspergillus niger*.

C'est peut-être à l'une de ces causes qu'il faut rapporter les résultats de l'expérience suivante, où nous allons voir qu'on peut constater, d'une façon très nette, le dédoublement du maltose dans le liquide de culture de l'*Eurotiopsis*.

On a fait pousser la moisissure sur un liquide de culture renfermant un mélange de maltose et de glucose en proportions à peu près égales, contenu dans un matras plus petit que d'habitude, où l'épaisseur de la couche de liquide était plus que doublée, et dans lequel on faisait arriver l'air en quantité plus ménagée que précédemment ; la température étant celle du laboratoire, de 20 à 25°.

Dans ces nouvelles conditions, la plante a mis deux fois plus de temps pour faire disparaître le sucre, et les prises successives faites dans le liquide ont donné les résultats suivants :

	Maltose 0/0	Glucose 0/0
	gr.	gr.
Liquide primitif.....	3.86	3.51
1 <sup>er</sup> essai.....	2.46	3.50
2 <sup>e</sup> essai.....	4.57	3.94
3 <sup>e</sup> essai.....	0.40	2.21

Le maltose semble donc disparaître plus vite que le glucose, et la quantité de ce dernier sucre qui existe dans le liquide à un moment donné, est supérieure à la quantité initiale introduite ; cela ne peut se produire que si le maltose est transformé en glucose.

Avec le maltose seul, dans les mêmes conditions physiques, les résultats sont bien moins nets. Cultivée dans les conditions ordinaires sur le mélange de maltose et de glucose, la plante fait disparaître les deux sucres parallèlement, ou bien le glucose est consommé plus vite, et le maltose disparaît ensuite comme s'il avait été seul.

1. Recherches sur la sucrase. (*Thèse pour le doctorat ès sciences. Paris 1890.*)

En somme tous les résultats qui précèdent permettent de confirmer l'opinion généralement admise, que le maltose n'est pas directement assimilable par un être vivant.

*Sucre interverti.* — Le sucre interverti est en général un aliment de prédilection pour les moisissures, et nous avons déjà vu qu'il convient à l'*Eurotiopsis*. Cependant, les conditions physiques de la culture étant les mêmes que pour les aliments employés ci-dessus, la végétation n'est jamais bien prospère. Malgré une aération énergique, le sucre disparaît beaucoup plus par fermentation que par combustion complète, comme le montrent les résultats ci-dessous :

DATES	Sucre réduct.	Alcool en vol.	Sucre fermenté.	Sucre brûlé.
	0/0	0/0	0/0	0/0
	gr.	c.c.	gr.	gr.
22 mai...	4.80	0.0	0.00	0.00
30 — ...	2.78	0.8	1.28	0.74
4 juin...	traces..	2.0	3.20	1.60
46 — ...	0.00	4.0	»	»

Le sucre disparu par combustion complète n'est donc que le 1/3 du sucre total consommé; l'alcool produit disparaît à son tour lorsque le sucre fait défaut.

Ici le rendement n'est environ que le 1/3 du chiffre 35 0/0, obtenu dans les cultures où le liquide était étalé sous une épaisseur de quelques millimètres et maintenu à la température de 28° au maximum. Plus on s'écarte de ces conditions physiques, en augmentant l'épaisseur du liquide et principalement la température, plus la plante tend à substituer la fermentation à la combustion complète du sucre, qui finit par devenir le phénomène accessoire, surtout si l'aération est insuffisante.

A la température de 25° environ, même avec une couche un peu épaisse de liquide, l'*Eurotiopsis* a peu de tendance à la fermentation, car le sucre peut disparaître rapidement sans que la quantité d'alcool produit dépasse 0,2 0/0. Dans ces nouvelles conditions, où le phénomène d'assimilation de l'aliment est simple, on peut chercher à savoir de quelle manière est attaqué le mélange de glucose et de lévulose constituant le sucre interverti. Dans une expérience où l'on a doublé la proportion ordinaire de sucre pour mieux suivre l'action, les prises faites dans le liquide ont fourni les chiffres suivants :

DATES	Rotation observée.	Sucre réduct.	Glucose.	Lévulose.
		0/0	0/0	0/0
	div. sacch.	gr.	gr.	gr.
16 Juillet. Liquide primitif.	49.0	10.00	4.96	5.04
25 — 1 <sup>er</sup> essai.....	46.0	7.43	2.36	3.78
26 — 2 <sup>e</sup> — .....	44.5	4.35	1.70	2.65
27 — 3 <sup>e</sup> — .....	43.5	2.60	0.65	1.95
28 — 4 <sup>e</sup> — .....	41.0	1.40	0.07	1.33

On voit que le glucose disparaît plus vite que le lévulose ; l'*Eurotiopsis* est donc capable d'exercer une combustion élective du sucre interverti. Cette préférence pour le glucose est assez constante lorsqu'il y a combustion complète, mais nous verrons qu'elle peut devenir nulle ou changer de signe lorsque le sucre fermenté en même temps.

*Glucose.* — Le glucose seul a un peu moins de tendance à subir la fermentation alcoolique que le sucre interverti.

*Lévulose.* — Avec le lévulose, la végétation est très vigoureuse ; il disparaît par combustion complète et aussi rapidement que le sucre interverti ; il n'y a que très peu d'alcool produit même dans le cas d'un manque relatif d'oxygène.

Si l'on compare l'action, sur la végétation de l'*Eurotiopsis*, du glucose et du lévulose pris isolément, il semble que, lorsqu'ils sont mélangés dans le sucre interverti, la végétation doive bénéficier de l'influence du lévulose ; il n'en est rien, comme on l'a vu ; ce mélange hétérogène exerce sur le développement de la plante une action propre.

*Saccharose.* — Quand on stérilise le liquide Raulin par l'ébullition, on n'a plus alors du sucre cristallisable seul en solution, puisqu'il est interverti en partie par l'acide tartrique libre. Avec un liquide contenant 1 gr. 6 de sucre réducteur et 3 gr. 23 de sucre cristallisable pour 100 c. c., la végétation s'est produite tout d'abord dans des conditions normales. Des îlots assez vigoureux se sont formés en surface, avec tendance à la couvrir entièrement de mycélium. Pendant ce temps, le sucre réducteur diminuait et disparaissait ; la quantité initiale de sucre cristallisable diminuait aussi, mais en quantité de plus en plus faible pendant un temps donné. La vie de la plante semblait donc s'arrêter ; et, en effet, la végétation restait à peu près stationnaire.

La cause qui produisait l'interversion et facilitait l'assimilation par la moisissure diminuait donc de plus en plus ; elle

n'était autre que l'acidité du liquide, qui devient de plus en plus faible pendant que la plante vieillit dans le milieu où elle est née. Si on prend un liquide Raulin qui ne contient que la moitié de la quantité normale d'acide tartrique, il arrive un moment où cette acidité devient nulle, mais le sucre cristallisable n'en continue pas moins à disparaître très lentement; l'interversion se fait alors uniquement dans l'intérieur des cellules, grâce à l'acidité du protoplasma. En effet, bien que le liquide de culture soit neutre ou même légèrement alcalin, une infusion de la moisissure bien lavée est toujours acide; cette acidité paraît provenir principalement de l'acide succinique.

Les expériences précédentes permettent de croire à une absence presque complète de production de sucrase par l'*Eurotiopsis*, mais ne démontre pas ce fait d'une manière complète; les suivantes permettent de mieux l'affirmer.

Si dans de l'eau de levure neutre on introduit du saccharose, on a un liquide qui peut être stérilisé et conservé longtemps à l'étuve sans que l'interversion du sucre soit sensible. Le développement du champignon semé dans ce liquide n'a pas dépassé celui qu'il a atteint dans l'eau de levure seule. Au bout de plusieurs mois qu'a duré l'expérience, on n'a obtenu qu'un peu de mycélium immergé; le sucre est resté un corps inerte pour la plante qui n'a pu, comme dans les expériences précédentes, se procurer d'abord les moyens de l'invertir en dehors d'une production de sucrase. Au bout de cette période de temps, assez longue pour rendre l'expérience concluante, on a ajouté au liquide une solution de sucrase d'*Aspergillus niger* stérilisée à froid. Immédiatement après, la végétation a pris un développement normal et tout le sucre a disparu par combustion et fermentation, après interverson par la diastase étrangère. On a fait une expérience analogue et on a obtenu des résultats identiques avec un liquide artificiel contenant par litre :

Sucre cristallisable .....	50gr
Nitrate d'ammoniaque .....	2
Phosphate de potasse .....	4
Sulfate de magnésie .....	0,1

Il fallait tenir compte, dans la composition de ce dernier liquide, d'un fait déjà signalé et qui aurait pu induire en erreur.

Si on avait remplacé le nitrate d'ammoniaque par un autre sel ammoniacal, tel que le sulfate, le chlorhydrate ou le tartrate, qui sont décomposés pour fournir l'azote à la plante, l'acide mis en liberté aurait pu jouer le rôle de sucrase. C'est ce qui ressort de l'expérience suivante où le liquide était le même que ci-dessus, sauf que le sulfate d'ammoniaque remplaçait le nitrate.

La végétation très difficile au début prit, à un moment donné, un développement assez rapide qui permit par la suite d'obtenir les résultats suivants :

DATES	Sucre réduct.	Sucre cristall.	Acidité en $\text{SO}_4\text{H}_2$
	0/0 gr.	0/0 gr.	p. litre. gr.
5 Mars.....	traces.	4.50	traces.
15 — .....	3.00	1.00	1.00
24 — .....	2.75	0.22	1.70
31 — .....	1.40	0.00	1.90
7 Avril.....	0.60	0.00	1.96

On voit que la proportion d'acide mis en liberté était parfaitement suffisante pour intervertir le sucre qui a été consommé par combustion et fermentation ; il s'est produit 1,5 0/0 d'alcool.

En remplaçant le sulfate par le tartrate d'ammoniaque, les résultats sont du même genre, mais avec des différences dépendant de la nature du sel employé et de l'acide mis en liberté.

En résumé, les expériences qui précèdent démontrent suffisamment que ce n'est pas à la faveur d'une action diastasique que le saccharose devient assimilable pour l'*Eurotiopsis*, mais qu'il peut être consommé lentement, grâce à sa facile interversion par l'acidité des liquides de culture ou simplement par celle du liquide cellulaire du champignon. On peut, d'ailleurs, vérifier directement que ni le liquide de culture ni le liquide cellulaire ne peuvent exercer une action diastasique sur le sucre de canne, en procédant comme on l'a fait précédemment pour mettre en évidence une action de ce genre.

*Lactose*. — Ensemencé sur le liquide Raulin au lactose dans les conditions physiques indiquées plus haut, l'*Eurotiopsis* ne donne jamais qu'un développement très faible. On n'obtient au bout d'un mois qu'un voile de mycélium immergé à la surface du liquide, avec quelques tubes aériens peu nombreux. Au bout de ce temps, on constate cependant la disparition de 5 grammes de sucre par litre.

En s'en tenant à ce résultat, on serait presque en droit de considérer le lactose comme ne pouvant servir au développement de la jeune plante; mais en employant un volume de liquide tel que l'épaisseur de la couche soit de quelques millimètres seulement, on constate que les germes se développent beaucoup plus facilement. Au bout d'un mois, on obtient une couche de moisissure assez vigoureuse, sous laquelle on peut introduire un liquide neuf, où l'on constate la disparition rapide du lactose pendant que le champignon se développe abondamment. On obtient le même résultat pour une plus grande épaisseur de liquide de culture, en employant, pour constituer ce liquide, au lieu d'eau pure, une infusion organique, telle que : eau de levure, bouillon Liebig, solution de peptone à 5 grammes par litre.

Il ne faudrait pas cependant attribuer à ces matières organiques un rôle plus important que celui qu'elles ont réellement, et croire, par exemple, qu'il consiste à fournir à la jeune plante des aliments plus faciles à utiliser que le lactose, et par suite à l'amener à un état de développement tel qu'elle puisse assimiler facilement le sucre.

On peut, en effet, sans cette addition, obtenir un développement aussi rapide et une végétation plus prospère au début, en réduisant simplement l'acidité du liquide de culture de 2<sup>o</sup>,3 à 1 gramme par litre. Dans ces conditions, la culture arrive à son maximum, et le sucre a complètement disparu dans un mois environ, tandis que, dans les conditions précédentes, ce temps était entièrement nécessaire pour que la plante commençât à exercer une combustion plus active du lactose, après une période de vie très pénible.

Si on relève, au contraire, l'acidité du liquide de culture, ou si on remplace l'acide tartrique par l'acide sulfurique à la dose de 0,5 par litre seulement, le développement est insignifiant dans le premier cas, et les spores ne germent même pas dans le second.

On voit, par conséquent, que l'assimilation plus ou moins facile du lactose par l'*Eurotiopsis* est liée à l'acidité du milieu de culture; d'ailleurs les changements dans les conditions physiques ou chimiques que nous venons de voir être favorables à une assimilation plus facile, avaient tous pour résultat de faire diminuer l'acidité naturelle du liquide dans un temps plus ou moins court.

En effet, dans le cas de la culture en mince épaisseur, on constate qu'au moment où la consommation du sucre devient maximum, après une longue période de vie difficile pour la plante, l'acidité du liquide a baissé de plus d'un gramme par litre. On sait que cela tient à des phénomènes de désassimilation de l'aliment azoté qui prennent ici une importance très grande, vu la longueur du temps. En couche épaisse, par contre, l'acidité n'a baissé que de quelques décigrammes dans le même temps, et cela se comprend, car la végétation était plus difficile et le volume de liquide 4 fois plus grand (800cc au lieu de 200). Comme le premier développement ne dépend que de la surface libre qui est la même, il aurait fallu, au minimum, 4 mois pour que l'acidité eût baissé de la même quantité. Dans le cas des matières organiques azotées ajoutées au lactose, l'acidité du liquide baisse plus rapidement, parce qu'il se produit une quantité d'ammoniaque plus grande dans le même temps.

Au cours de la combustion du lactose, on constate que le sucre qui reste dans le liquide de culture est toujours du lactose pur; par conséquent, ce sucre paraît être consommé par l'*Eurotiopsis* comme par l'*Aspergillus niger* adulte<sup>1</sup>, sans dédoublement préalable en glucose et galactose, au moins dans le liquide nutritif<sup>2</sup>. Cependant, par analogie avec les autres saccharoses, on n'admet pas généralement qu'il soit directement assimilable, et récemment, M. Fischer (*l. c.*), à l'aide des moyens qu'il emploie pour caractériser les sucres, paraît avoir réussi à montrer ce dédoublement par une levure de lactose.

On n'a pu, toutefois, jusqu'à présent, constater, par les moyens ordinaires, la transformation du lactose par une diastase correspondante, la *lactase*, produite par les champignons microscopiques. Je vais essayer de montrer qu'on peut y parvenir avec l'*Eurotiopsis*.

1<sup>o</sup> Après disparition complète du sucre dans une culture disposée comme il a été dit plus haut, on a soutiré, par le siphon du vase de culture, une partie du liquide, pour le faire passer dans un matras Pasteur stérilisé, dans lequel on a ajouté ensuite une solution concentrée et stérilisée de lactose pur, de façon à avoir environ 20/0 de sucre. Puis on a introduit la moitié de ce mélange dans un second matras Pasteur que l'on a porté à l'ébullition pour servir de témoin.

1. Nutrition intracellulaire (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, 1<sup>er</sup> mémoire).

2. L'emploi du polarimètre et de la liqueur de Fehling est d'ailleurs un moyen assez insuffisant pour constater la présence du lactose interverti dans une solution de lactose, en raison de ce fait que, dans l'intervention du lactose, le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur augmentent en même temps; à moins qu'on n'ait un liquide témoin ou la rotation et la réduction n'ont pas varié.

2<sup>e</sup> La moisissure, tritée avec du sable, a été mise à digérer, pendant quelques heures, à une douce température, dans de l'eau thymolisée; puis, après filtration, le liquide a été additionné de 2 % de lactose et divisé en deux parties dont l'une, portée à 100°, servait de témoin.

Ces quatre essais, maintenus à la température de 50° pendant 48 heures, sont restés stériles et ont donné les résultats suivants:

	Rotation observée.	Réduction glucose 0/0.	Lactose interverti 0/0.	Lactose non interverti 0/0.
	div. sacc.	gr.	gr.	gr.
Liquide N° 1 ...	42.5	1.95	1.44	0.73
Témoin.....	41.0	1.56	0.00	2.28
Liquide N° 2 ...	42.5	2.02	2.02	0.00
Témoin.....	40.0	1.42	0.00	2.07

Il est facile de voir que dans les liquides n° 1 et n° 2, le lactose a été dédoublé, tandis qu'il est resté intact dans les témoins. Les résultats de l'analyse ont été parfaitement vérifiés par l'expérience suivante:

On aensemencé avec une levure de vin pure, d'espèce unique et ne faisant pas fermenter le lactose, le reste des liquides analysés (pour les deux derniers on a d'abord chassé le thymol); stérilisés préalablement, et on les a mis à l'étuve à 30°.

Une fermentation assez active s'est développée dans les matras n° 1 et n° 2, et au bout de trois jours, elle était terminée; le liquide s'était éclairci et contenait un dépôt assez abondant de levure. Dans les témoins, au contraire, la levure s'était à peine développée, il n'y en avait qu'un dépôt insignifiant; la rotation et la réduction n'avaient pas sensiblement varié, tandis que les liquides n° 1 et n° 2 ont fourni les chiffres suivants:

	Rotation observée.	Réduction glucose 0/0.	Lactose restant 0/0.	Alcool. 0/0
	div. sacc.	gr.	gr.	c. c.
Liquide N° 1 ...	3	0.46	0.67	0.7
Liquide N° 2 ...	0	0.00	0.00	1.0

Par conséquent, les résultats précédents, complétés par ces derniers, établissent, sans aucun doute que le liquide de culture et le liquide cellulaire de l'*Eurotiopsis* sont capables d'exercer une action diastasique sur le lactose, le dédoublant en glucose et galactose, action sans laquelle ce saccharose ne saurait être assimilé par la plante.

L'influence de l'acidité sur cette action diastasique apparaît dans les résultats suivants, obtenus en faisant agir, avec des doses d'acide tartrique variables, le même volume du liquide de culture employé ci-dessus sur des quantités égales de lactose, pendant 48 heures à 50°.

Acide tartrique, par litre.....	0gr,00	0gr,50	0gr,75	1gr,00	2gr,00
Lactose dédoublé p. 100 c. c. traces..	0 , 65	1 , 44	0 , 81	0 , 00	

D'après ces chiffres, la réaction est favorisée par une certaine dose d'acide, voisine de 0<sup>gr</sup>75, au-dessous et au-dessus de laquelle la transformation du lactose décroît très rapidement.

L'influence de l'acidité se fait donc sentir d'une manière toute différente et absolument inverse dans l'assimilation du saccharose et du lactose par l'*Eurotiopsis*. Tandis que le premier n'est assimilé que grâce à la présence de l'acide, le second, au contraire, n'est assimilé qu'à la faveur d'une action diastasique qui est très sensible aux variations de l'acidité. Quand l'accroissement de la moisissure était très faible, c'est que l'acidité était trop élevée, qu'elle paralysait presque complètement l'action diastasique de la plante et rendait par suite l'assimilation du sucre très difficile; aussi, en diminuant l'acidité, a-t-on vu la végétation devenir plus intense.

On voit par l'étude des propriétés de l'*Eurotiopsis* vis-à-vis de ces deux derniers saccharoses, combien il faut être prudent avant de conclure qu'un sucre, qui n'est pas directement assimilable, est ou n'est pas un aliment pour une cellule vivante déterminée, et par suite que la cellule exerce ou n'exerce pas une action diastasique sur cet aliment.

*Lactose interverti.* — Le mélange du glucose et de galactose qui constitue cette matière sucrée, convient parfaitement à la vie de l'*Eurotiopsis*, car il fournit une végétation très vigoureuse. L'analyse des prises successives faites dans le liquide de culture montre que la rotation et la réduction correspondent toujours très sensiblement à du lactose interverti; il n'y a donc pas de préférence bien nette pour l'un des termes du mélange, et par suite pas de combustion élective. Il n'y a pas non plus de tendance à la fermentation alcoolique aussi prononcée qu'avec le glucose seul, si la plante a une quantité d'air suffisante à sa disposition.

*Galactose.* — Employé seul, ce sucre paraît être un peu plus résistant que le mélange précédent, surtout pour le mycélium provenant des conidies. Si on ensemence des périthèces seuls, la végétation est plus active.

*Tréhalose.* — L'*Eurotiopsis* se développe bien aux dépens du tréhalose, surtout si on diminue un peu l'acidité ordinaire du milieu nutritif. Au cours de ce développement, on constate une production de sucre réducteur, indice d'une propriété diastasique.

En effet, le liquide de culture et le liquide cellulaire de la moisissure sont capables de provoquer le dédoublement du tréhalose en glucose; il y a donc production de *tréhalase*, et le tréhalose n'est pas directement consommé par la plante.

*Glucosides.* — Les glucosides étudiés ont été l'amygdaline, la coniférine et la salicine. L'*Eurotiopsis* pousse presque aussi bien avec les deux premiers qu'avec le glucose: le troisième n'est consommé que par le champignon adulte. La coniférine, qui est peu soluble à la température ordinaire, cristallise par refroidissement après stérilisation du liquide de culture; pendant le développement de la moisissure, elle est redissoute très rapidement, et l'on constate une production assez abondante de glucose. Ce sucre est produit aussi, mais en plus petite quantité, avec les deux autres glucosides. Les autres produits du dédoublement de ces corps paraissent brûlés en même temps que le glucose. On réussit à montrer dans les trois cas que le dédoublement est le fait d'une action diastasique, analogue à celle que produit l'émulsine ou synaptase, diastase des amandes amères.

*Alcools.* — C'est principalement dans son action sur ses matières hydrocarbonées que l'*Eurotiopsis* se distingue des autres moisissures de sa famille. Les alcools sont en général des corps improches à constituer de jeunes tissus, mais, pour l'*Eurotiopsis*, il y a de nombreuses exceptions, comme nous allons le voir.

*Alcool éthylique.* — C'est l'alcool que nous avons vu se produire aux dépens des sucres dans certaines conditions d'existence de la moisissure; il sert ensuite à son entretien et à son accroissement; il peut aussi servir au développement des spores quand sa proportion n'est pas trop élevée.

Dans le milieu minéral du liquide Raulin contenant 4 à 5 %

d'alcool, les spores surnageantes donnent de petits îlots parfaitement circulaires qui s'élargissent en rayonnant, tandis que les spores noyées donnent un mycélium immergé qui finit par garnir les vides de la surface du liquide. La couche très abondante de moisissure, qui se produit ainsi, est toujours très irrégulière; au centre des îlots primitifs le thalle est très dense et l'épaisseur souvent considérable, car elle peut dépasser un centimètre.

L'alcool disparaît sous forme de matière organique, d'eau et d'acide carbonique, sans aucun produit intermédiaire tel que l'acide acétique ou l'acide oxalique, et avec une rapidité comparable à celle des sucres, lorsque la végétation a franchi la période du début, où la résistance de l'aliment est plus grande. Chose singulière, il paraît être brûlé beaucoup plus facilement lorsque la moisissure s'est développée dans ces dernières conditions que lorsqu'elle a produit elle-même l'alcool, avec le sucre interverti par exemple; cela doit tenir probablement à une différence d'organisation. À part les fermentations spéciaux de l'alcool, qui sont, d'ailleurs, à un degré bien inférieur de l'échelle des êtres vivants, l'*Eurotiopsis* est, je crois, le seul exemple que l'on connaisse pour lequel l'alcool, qui est un aliment très résistant pour toutes les cellules jeunes, est assimilé au moment de la germination des spores.

M. Duclaux a montré que si l'alcool est funeste à l'*Aspergillus niger* en voie de germination, la plante adulte en supporte 6 à 8 0/0 et le brûle. Avec l'*Eurotiopsis* on peut aller jusqu'à 10 0/0, et même, si on submerge la moisissure dans un liquide qui en contient 8 0/0, elle continue à pousser en émettant des tubes aériens, et à s'en nourrir.

*Autres alcools monoatomiques.* — Parmi les autres alcools, l'alcool méthylique bien pur permet seul un développement des spores et disparaît très lentement. Les alcools propylque, butylque, amylique ne donnent rien, même en petite proportion, mais n'ont pas d'action toxique sur les spores ensemencées. Ces alcools sont tous brûlés en petite quantité par une moisissure adulte.

*Glycérine.* — La glycérine est un aliment un peu inférieur à l'alcool vinique; la végétation est moins rapide au début, surtout si les périthèces sont en petit nombre, et le thalle formé par la suite paraît moins vigoureux. La combustion de la

glycérine ne s'accompagne d'aucun corps intermédiaire.

*Mannite.* — La mannite est tout à fait comparable au lévulose pour la rapidité du développement du jeune champignon et pour l'intensité de la végétation. La couche de moisissure est épaisse, d'aspect moelleux et de couleur rosée. La mannite paraît directement assimilable par l'*Eurotiopsis*, absolument comme pour l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum* à l'état adulte; le pouvoir rotatoire du liquide de culture ne change pas, et on n'y trouve que de la mannite pendant toute la durée de la combustion, qui peut fournir un peu d'acide oxalique comme produit intermédiaire<sup>1</sup>. Avec l'*Eurotiopsis*, cet acide ne se forme jamais.

*Autres alcools polyatomiques.* — Les essais, qui n'ont été faits que sur de petites quantités, vu la rareté de ces produits, ont montré que le glycol paraît tenir le milieu entre l'alcool ordinaire et la glycérine; l'érythrite se place plus près de la glycérine, tandis que la dulcite et l'isodulcite sont totalement impropre au développement de la plante.

*Acides organiques.* — Ensemencées sur le liquide Rauliu sans sucre, les spores de l'*Eurotiopsis* germent à la faveur des réserves qu'elles contiennent, mais il n'y a pas d'accroissement possible pour la petite touffe de mycélium. La plante adulte ne consomme pas davantage l'acide tartrique.

Avec l'acide citrique, on obtient le même résultat.

L'acide oxalique est brûlé par la plante adulte seulement, et encore difficilement. A la proportion de 5 %, l'acide lactique et l'acide succinique permettent parfaitement la germination des spores, qui forment des îlots au début comme avec l'alcool. La couche de moisissure devient assez vigoureuse, et fait disparaître l'acide rapidement. Dans une expérience sur l'acide lactique inactif, où l'on a arrêté l'action lors que les 4/5 de la quantité initiale avaient été brûlés, on a reconnu que celui qui restait était encore inactif sur la lumière polarisée; par conséquent il n'avait pas été dédoublé en acides droit et gauche par la moisissure.

L'acide malique ne peut pas être employé à une dose aussi élevée que les deux précédents; la proportion maxima est de 2 0/0, et il ne fournit jamais qu'une végétation languissante. En ce sens, il se rapproche beaucoup de l'acide tartrique, et l'on

1. M. DUCLAUX. Nutrition intra-cellulaire.

voit que la plante éprouve des difficultés de plus en plus grandes pour assimiler la molécule d'acide à mesure qu'elle se complique.

Parmi les principaux acides gras volatils, il n'y en a aucun qui permette la germination des spores, mais ils peuvent être consommés par un mycélium déjà développé si la proportion ne dépasse pas 1 0/0 pour l'acide formique, 2 0/0 pour les acides acétique et propionique, 0,8 0/0 pour l'acide butyrique, et 0,5 0/0 seulement pour l'acide valérianique. A ces doses, ils exercent même une action marquée sur la plante. Avec la méthode de M. Duclaux<sup>1</sup> pour la détermination et le dosage des acides volatils, on peut savoir, dans le cas d'un mélange de deux acides, quel est celui qui est brûlé le premier. On a fait des mélanges à des doses supportables : 1<sup>o</sup> d'acide formique et d'acide acétique; 2<sup>o</sup> d'acide acétique et d'acide propionique; 3<sup>o</sup> d'acide propionique et d'acide butyrique; 4<sup>o</sup> d'acide butyrique et d'acide valérianique, et on les a mis en contact avec la moisissure jusqu'à ce que l'acidité fût réduite au 1/3 ou au 1/4. On a trouvé ainsi que la résistance des acides volatils à la combustion s'élève en même temps que leur poids moléculaire, comme pour les acides fixes.

*Gomme arabique.* — La gomme arabique peut servir à la nutrition de la plante adulte seulement; on a vu, pour une solution à 10 0/0, la rotation tomber de — 17° à — 13° au bout d'un mois environ, et on a constaté la formation de traces de sucre réducteur.

*Inuline.* — L'inuline est exclue complètement de l'alimentation de l'*Eurotiopsis*, qui ne peut exercer, à aucune période de son existence, l'action diastasique capable de transformer cet hydrate de carbone en lévulose, pour le rendre assimilable.

*Matières grasses.* — On obtient la germination des spores de l'*Eurotiopsis* et leur développement complet quand on les sème dans un milieu constitué par une solution minérale nutritive portant à sa surface une couche d'huile ou de beurre filtré. Le corps gras subit une action énergique qui se traduit par une formation abondante d'acide carbonique et un changement notable de son état physique. Le beurre, de liquide qu'il était à la température de l'étuve, devient solide et prend la consistance de la cire à la température ordinaire; l'huile finit par pouvoir se

1. Recherches sur les vins (*Ann. de Ch. et de Phys.*, 3<sup>e</sup> série t. III, 1894).

figer à cette dernière température, en prenant l'aspect et la consistance du beurre figé après fusion.

Le dosage des acides gras fixes dans l'huile et dans le beurre, avant et après l'action de la moisissure, donne dans chaque cas des nombres très différents, indiqués ci-dessous :

	ACIDES GRAS FIXES	
	Avant 0/0	Après 0/0
Beurre.....	89.50	96.50
Huile .....	87.90	96.25

#### IV. — VALEUR ALIMENTAIRE COMPARATIVE DE QUELQUES ALIMENTS HYDROCARBONÉS.

Les aliments hydrocarbonés de l'*Eurotiopsis* étant connus, nous allons chercher, pour les plus importants d'entre eux, quelle est leur valeur alimentaire comparative pour cette plante, c'est-à-dire leur influence sur le rendement des récoltes.

En faisant des cultures dans les conditions physiques et chimiques reconnues les meilleures, on a obtenu les résultats consignés dans le tableau suivant qui indique : 1° la durée de la culture; 2° le poids des récoltes séchées à 100°; 3° le rendement moyen journalier de ces récoltés pour 100 gr. de l'aliment consommé.

La semence était constituée par des périthèces seulement, et le moment de la récolte était celui où il ne restait plus que des traces de l'aliment hydrocarboné dans le liquide de culture.

ALIMENTS HYDROCARBONÉS.	DURÉE de la culture en jours.	POIDS des récoltes.	RENDEMENT moyen 0/0.
Amidon.....	20	2.50	1.25
Dextrine.....	20	2.00	1.00
Maltose.....	9	3.00	3.33
Sucre interverti.....	6	2.90	4.83
Glucose.....	6	2.90	4.83
Lévulose.....	6	3.00	5.00
Lactose.....	15	3.25	2.46
Lactose interverti.....	7	2.90	4.14
Galactose.....	8	2.85	3.56
Mannite.....	6	2.90	4.83
Alcool.....	12	4.40	3.66
Glycérine.....	20	3.10	4.55
Acide succinique.....	12	2.50	2.10
Acide lactique.....	12	2.60	2.16

On voit que les chiffres de la deuxième colonne du tableau varient beaucoup plus que ceux de la troisième, par suite les rendements moyens journaliers établissent entre les différents aliments des différences beaucoup plus sensibles que celles qui ressortent des rendements bruts exprimés par les chiffres de la troisième colonne.

Les rendements moyens les plus élevés et les plus constants sont fournis par les sucres directement assimilables, parmi lesquels le lactose interverti et le galactose sont un peu inférieurs aux autres comme valeur alimentaire; au second rang se placent l'alcool, les sucres indirectement assimilables et les acides organiques; enfin, vient le groupe comprenant l'amidon, la dextrine et la glycérine.

Pour l'amidon et la dextrine, les rendements peuvent paraître anormaux, étant donnée la facilité assez grande avec laquelle ils sont saccharifiés par la plante. Mais on sait que leur constitution chimique est loin d'être homogène, qu'il y a amidon et amidon comme il y a dextrine et dextrine. Les parties les moins résistantes à l'action diastasique de la plante sont brûlées les premières, tandis que les plus réfractaires ne le sont qu'en dernier lieu et ne disparaissent que très lentement. La plante ne trouve donc plus à un moment donné que des aliments médiocres; elle attaque alors ses réserves, formées au début, et les consomme d'autant plus que les aliments convenables font plus vite défaut dans le liquide de culture. A la période d'accroissement du début a donc succédé une période d'autophagie et de désassimilation plus ou moins importante.

La glycérine présente à l'assimilation par la moisissure une résistance spécifique qui se traduit d'abord, comme on sait, par une gêne du premier développement.

A la température maximum de 28°, on a trouvé un rendement moyen voisin de 6 0/0 avec le sucre interverti, tandis qu'actuellement, à la température de 32°, il atteint à peine 5 0/0; la différence ne peut s'expliquer que par une respiration plus active de la plante à cette dernière température. En somme le rendement de l'*Eurotiopsis* est peu différent de celui que l'on obtient avec l'*Aspergillus niger* dans les conditions indiquées par M. Raulin; mais le rendement de cette dernière plante peut être considérablement relevé si la culture est faite dans des conditions physiques analogues à celles qui ont été employées pour l'*Eurotiopsis*, c'est-à-dire avec 200 c. c. de liquide Raulin contenant 9 gr. 5 de sucre candi, étalé en couche mince sur le fond

d'un grand matras Duclaux dont l'ouverture est complètement libre à l'accès de l'air. La récolte, faite peu de temps après la disparition du sucre, au bout de trois jours environ, donne un poids de plante sèche égal à 4<sup>gr</sup>,6, d'où un rendement moyen de 15,3 0/0, c'est-à-dire triple du rendement ordinaire. Si on compare maintenant ce dernier chiffre avec le meilleur rendement de l'*Eurotiopsis* qui est voisin de 6 0/0, on trouve que l'*Aspergillus niger* se développe environ 2,5 fois plus vite que l'*Eurotiopsis*.

En laissant de côté la question de temps employé à consommer un poids déterminé d'aliment, et ne considérant que le rendement final, on voit qu'avec l'*Eurotiopsis*, nourri au moyen de l'alcool, le rendement est presque égal à celui que fournit l'*Aspergillus niger* dans des conditions analogues de culture, 44 au lieu de 46 0/0.

De plus, si on prend trois types d'aliments qui ont donné des résultats bien tranchés, le glucose, l'alcool et l'acide succinique, il est facile de calculer la quantité d'oxygène nécessaire pour brûler complètement un poids déterminé de chacun d'eux, 10 grammes par exemple. On trouve 10<sup>gr</sup>,6 pour le glucose, 20 grammes pour l'alcool et 9<sup>gr</sup>,5 pour l'acide succinique; et si on compare ces chiffres à ceux des poids des récoltes fournies par ces mêmes aliments, savoir : 2<sup>gr</sup>,9 pour le glucose, 4<sup>gr</sup>,4 pour l'alcool et 2<sup>gr</sup>,5 pour l'acide succinique, la relation est évidente. Le poids de plante est d'autant plus élevé qu'il faut plus d'oxygène pour brûler entièrement un poids égal des types d'aliments de constitution moléculaire homogène.

#### V. — FONCTION DIASTASIGÈNE DE LA PLANTE.

Nous avons constaté, en étudiant l'alimentation hydrocarbonée de l'*Eurotiopsis*, que cette moisissure peut exercer les actions diastasiques nécessaires pour rendre assimilables l'amidon, la dextrine, le maltose, le lactose, le tréhalose et certains glucosides. En d'autres termes, et pour employer le langage courant, on peut dire que l'*Eurotiopsis* produit de l'amylase, de la maltase, de la lactase, de la tréhalase et de l'émulsine.

Il était intéressant de rechercher, pour tous les aliments avec lesquels on peut obtenir un développement important de la plante, quelles sont les diastases élaborées. Cette recherche a montré que, dans tous les cas, à la fin du développement, le liquide de

culture et les cellules de la moisissure paraissent contenir ces diverses diastases.

En présence de ce fait, une autre question se posait alors naturellement : quelle est l'influence de l'aliment sur la quantité des diverses diastases produites par la plante ; autrement dit, quelle est, pour les diverses substances qui peuvent subir une action diastasique de la part de l'*Eurotiopsis*, la quantité de matière transformée, toutes choses égales d'ailleurs, par la culture obtenue avec chaque aliment considéré ?

Cette question est très vaste, si on admet que chaque diastase est une substance chimique possédant une individualité propre ; aussi, sans abandonner encore complètement cette hypothèse, pour ne pas être entraîné trop loin, on considérera seulement l'action diastasique produite par l'amylase, parce qu'elle est la plus apte à mettre en relief les faits qui vont suivre.

Pour apprécier des quantités d'amylase, il fallait commencer par rechercher un procédé de dosage de son action ; celui que j'ai employé, bien qu'il ne comporte pas la précision du procédé indiqué par M. Fernbach<sup>1</sup> pour la sucrase, m'a cependant donné ici des résultats suffisants.

Les meilleures conditions d'acidité et de température du milieu étant connues et déterminées comme on le verra plus loin, on faisait agir sur 1<sup>er</sup>, 5 d'amidon de blé, à l'état d'empois, des volumes de liquide diastasifère, ou des poids de moisissure finement triturée tels, que la quantité d'amidon transformé en 48 heures fut environ les 2/3 de la quantité mise en expérience. Les essais ont été répétés avec toutes les cultures qui ont servi à constituer le tableau de la page 23, et l'on a trouvé ainsi que la quantité d'amylase produite par la moisissure ayant consommé un poids déterminé d'un aliment donné, dépend de la nature de cet aliment.

Cependant la fonction est loin d'être simple, car elle comporte deux facteurs au moins, le poids "de la plante, et l'état physiologique de son développement, le premier étant lui-même fonction du second.

Il est facile de montrer l'influence de ce second facteur en recherchant, par la même méthode que ci-dessus, les quantités d'amylase produites, dans des cultures parallèles sur le même

1. Recherches sur la sucrase. (Ces Annales, 1889.)

aliment, à des époques successives de la vie de la plante.

On trouve les résultats suivants avec la maunite, qui se prête très bien à cette expérience parce qu'elle ne réduit pas la liqueur de Fehling.

AGE de la culture.	POIDS de plante sèche.	GLUCOSE PRODUIT PAR		GLUCOSE total.
		le liquide.	les cellules.	
5 jours.	1.9	gr. 0.00	gr. 3.20	gr. 3.20
7 —	2.9	3.20	4.80	8.00
12 —	1.7	6.65	4.20	10.25
40 —	1.8	5.60	2.66	8.26

La production totale d'amylase augmente à mesure que l'aliment hydrocarboné diminue, pour atteindre un maximum, non pas au moment où cet aliment vient d'être épuisé, mais bien quelque temps après : la quantité produite disparaît ensuite plus lentement qu'elle n'a augmenté. Ce maximum ne correspond donc pas au maximum du poids des cellules ; il est plutôt en relation avec les phénomènes physiologiques de désassimilation qui entraînent la disparition des réserves de la plante sous l'influence de l'inanition. C'est sous cette influence encore que l'on observe le passage dans le liquide de culture d'une plus grande quantité de produits de désassimilation, auxquels paraissent intimement liées les propriétés diastasiques de ce liquide. On a déjà vu, à propos de la nutrition au moyen du maltose, et les résultats ci-dessus le montrent encore, que la marche de la diffusion diastasique chez l'*Eurotiopsis* est analogue à celle qui a été indiquée par M. Fernbach chez l'*Aspergillus niger*. Mais pour ce dernier, le maximum de la production diastasique est atteint alors qu'il est arrivé au tiers seulement de son poids total. Il y a donc, avec l'*Eurotiopsis*, une différence qui peut tenir à ce que la fonction diastasigène n'est pas la même pour les deux champignons, et aussi à ce que l'*Aspergillus niger* étant un producteur de diastases beaucoup plus puissant que l'*Eurotiopsis*, il est plus difficile, avec le premier qu'avec le second, de mettre en relief de petites différences comme celles que nous venons de constater.

Les variations de la fonction diastasigène de la plante ne sont pas particulières à l'amylase; c'est un fait général pour toutes les diastases que peut produire la moisissure, quelle que soit la nature de l'aliment consommé.

Si on étudie maintenant l'influence de l'alimentation azotée sur la production d'amylase par l'*Eurotiopsis*, on trouve qu'il n'y a pas de différences bien sensibles lorsqu'il emprunte l'azote aux diverses sources reconnues les meilleures pour son développement; les nitrates alcalins, par exemple, sont tout à fait comparables, à ce point de vue, aux matières albuminoïdes. Avec le sulfate ou le chlorhydrate d'ammoniaque, au contraire, la production d'amylase est presque nulle; peut-être est-elle détruite par les acides minéraux mis en liberté.

## VI. — ÉTUDE SPÉCIALE DE L'ACTION DIASTASIQUE DE LA PLANTE SUR L'AMIDON ET LE MALTOSE.

I. — Parmi toutes les actions diastasiques que peut exercer une culture d'*Eurotiopsis*, et dont le nombre est indépendant de l'aliment hydrocarboné, nous choisirons celles qui sont relatives à l'amidon et au maltose pour les étudier d'une façon spéciale.

Il a été établi que les produits de la saccharification de l'amidon sont de la dextrine et du glucose, et que le maltose subit le dédoublement ordinaire en glucose; cette double propriété étant commune, comme on sait, à d'autres moisissures, telles que l'*Aspergillus niger*, le *Penicillium glaucum*, l'*Aspergillus orizæ*.

Pour expliquer la différence qui existe dans la saccharification de l'empois d'amidon par l'amylase du malt qui donne de la dextrine et du maltose, et la saccharification de l'empois par l'amylase des moisissures, on admet, dans ce dernier cas, que les liquides actifs contiennent un mélange de deux diastases, une amylase analogue à celle du malt, et une maltase. Cette dernière transformant le maltose en glucose au fur et à mesure de sa production, on ne peut saisir la présence du maltose à aucun moment de la réaction. M. Atkinson<sup>1</sup>, en étudiant l'*Aspergillus orizæ*, a cru saisir la formation intermédiaire de maltose: mais ses résultats, manquant complètement de précision, ne fournissant aucune preuve satisfaisante.

1. ATKINSON. Sur la diastase du Kôdji (*Moniteur scientifique*, t. XXIV, 1882).

Donc, jusqu'à présent, ces actions diastasiques ont été très peu étudiées; les idées plus ou moins admises qui ont cours sont basées principalement sur l'hypothèse de l'individualité des diastases. Je vais essayer de démontrer que la manière de voir la plus en rapport avec les faits consiste à admettre, au moins pour les trois moisissures que j'ai étudiées, l'*Aspergillus niger*, le *Penicillium glaucum* et l'*Eurotiopsis Gayoni*, la production d'une diastase unique capable de saccharifier l'amidon en donnant de la dextrine et du glucose, sans passer par le terme intermédiaire maltose, et capable en même temps d'hydrolyser ce maltose, produit de l'action d'une diastase différente et unique en son genre, l'amylase du malt.

En faisant agir des volumes égaux d'une même solution diastasifère, respectivement sur 2 grammes d'amidon à l'état d'empois ou de maltose, les conditions physiques et chimiques étant les mêmes dans les deux cas, on trouve, en répétant la même série d'expériences avec les 3 moisissures, les résultats du tableau suivant :

DURÉES en HEURES	ASPERGILLUS NIGER		PENICILLIUM GLAUCUM		EUROTIOPSIS GAYONI	
	Amidon saccharifié	Maltose dédouble	Amidon saccharifié	Maltose dédouble	Amidon saccharifié	Maltose dédouble
12	4 <sup>sr</sup> 31	0 <sup>sr</sup> 57	4 <sup>sr</sup> 20	0 <sup>sr</sup> 89	0 <sup>sr</sup> 80	1. <sup>sr</sup> 34
24	1.51	0.68	1.31	0.70	1.20	0.72
48	1.61	0.93	1.57	1.02	1.61	0.92

La quantité de maltose dédouble pendant un certain temps de la réaction est donc toujours de beaucoup inférieure à la quantité d'amidon saccharifié. Il suit de là que l'on devrait pouvoir saisir assez facilement la présence du maltose pendant la saccharification de l'empois, et, comme cela n'est possible dans aucune condition, il faut choisir entre les deux hypothèses suivantes : la maltase n'existe pas et l'on n'a qu'une seule diastase qui a éprouvé plus de difficulté à dédoubler le maltose qu'à saccharifier l'amidon ; ou bien cette maltase a éprouvé elle-même plus de difficulté pour dédoubler le maltose apporté en provision de l'extérieur, qu'elle n'en éprouve pour dédoubler le maltose,

en quelque sorte à l'état naissant, qui résultait de l'action de l'amylase. Cette dernière hypothèse, quoique peu probable, mérite cependant d'être contrôlée. On a fait pour cela l'expérience suivante qui comporte trois essais :

On fait agir dans les mêmes conditions : 1<sup>o</sup> De l'extrait de malt sur de l'empois d'amidon à 2 0/0; 2<sup>o</sup> la même quantité d'extrait de malt, additionnée d'un certain volume de liquide diastasifère d'*Aspergillus niger*, sur la même quantité d'empois d'amidon ; 3<sup>o</sup> le même volume de liquide diastasifère seul sur la même quantité d'empois d'amidon.

La quantité d'extrait de malt et le volume du liquide diastasifère étant convenablement choisis, on a obtenu les résultats suivants à la température de 60°.

NUMÉROS des essais.	ROTATION saccharim.	RÉDUCTION glucose 0/0.	MALTOSE 0/0.	GLUCOSE 0/0.	DÉXTRINE 0/0
APRÈS 15 MINUTES					
1	27.5	1.08 gr.	1.78 gr.	0.00 gr.	0.25 gr.
2	23.0	1.31	1.48	0.45	0.15
3	22.4	0.71	0.00	0.71	0.45
APRÈS 30 MINUTES					
1	27.5	1.08	1.78	0.00	0.25
2	21.8	1.39	1.35	0.58	0.10
3	18.0	1.08	0.00	1.08	0.64
APRÈS 60 MINUTES					
2	49.8	1.56	1.26	0.79	traces
3	16.4	1.47	0.00	1.47	0.46

A l'examen de ces chiffres, on voit que si, dans le liquide n° 2, il y avait eu une maltase très active dédoublant le maltose à mesure qu'il prenait naissance, la quantité de glucose formée après quinze minutes devrait correspondre sensiblement au maltose produit par l'amylase du malt. Or il n'en est rien, cette quantité de glucose est même très inférieure à celle qu'a donnée le liquide n° 3, justement à cause de la résistance du maltose au dédoublement. Les chiffres obtenus au bout de 30 et 60 minutes montrent encore mieux cette résistance, car il se produit beaucoup moins de glucose dans le n° 2 que dans le n° 3.

Avec le *Penicillium glaucum*, on obtient des résultats tout à fait analogues ; mais, avec l'*Eurotiopsis*, on ne peut avoir un liquide diastasifère aussi énergique qu'avec les plantes précédentes ; cependant les chiffres de l'expérience suivante, quoique différents, sont tout aussi probants que ceux de tout à l'heure.

La proportion d'amidon a été réduite à 1,5 0/0 dans tous les liquides, et, pour avoir une différence appréciable entre le n° 1 et le n° 2, on a prolongé la durée de la réaction pendant 2 heures.

NUMÉROS des essais.	ROTATION saccharin	RÉDUCTION glucose 0/0.	MALTOSE 0/0	GLUCOSE 0/0.	DEXTRINE 0/0.
1	20	gr. 0,83	gr. 1,36	gr. 0,69	gr. 0,14
2	19	0,92	1,33	0,11	0,10
3	—	0,33	0,00	0,33	—

La quantité de glucose formé dans le n° 2 est encore beaucoup plus faible que dans le n° 3, alors qu'on aurait dû avoir l'inverse si la maltase avait existé.

Par conséquent, la seconde hypothèse que nous avions faite n'est vérifiée dans aucun des trois cas, et la première paraît devoir subsister seule.

En somme, on est donc autorisé à voir dans l'action, sur l'empois d'amidon et sur le maltose, des liquides diastasifères provenant de chacune des trois moisissures étudiées, le fait d'une diastase unique, d'une amylase spéciale que je désignerai sous le nom d'*amylomaltase*, et dont on connaît le rôle chimique.

II. — On peut se demander maintenant si les propriétés de l'*amylomaltase* de l'*Aspergillus niger*, du *Penicillium glaucum* et de l'*Eurotiopsis Gayoni* ne présentent pas certains caractères différentiels ?

Les liquides diastasifères employés avaient été obtenus en laissant séjourner, pendant un temps convenable, de l'eau distillée légèrement acidulée par l'acide tartrique et stérilisée, sous le thalle des moisissures obtenues dans des cultures pures. Dans les expériences qui vont suivre, pour avoir des résultats autant que possible comparables entre eux dans les trois cas, on a déterminé par des essais préliminaires, les conditions dans

lesquelles on devait se placer quant au rapport entre la quantité de liquide diastasifère et la quantité d'amidon ou de maltose, et quant à la durée de la réaction.

Examions d'abord, de plus près qu'on ne l'a fait jusqu'à présent, l'allure de la transformation de l'empois d'amidon pour les trois liquides diastasifères. On les a fait agir sur de l'empois à 20/0 dans les meilleures conditions d'acidité et de température déterminées plus loin, et l'on a fait des prises successives dans chaque liquide à des temps de plus en plus éloignés du commencement de l'action.

PROVENANCE des liquides diostasifères.	DURÉE en heures	ROTATION saccharim.	GLUCOSE 0/0.	DEXTRINE 0/0.
Aspergillus niger.....	12	47.5	4.34	0.56
	48	44.0	4.61	0.34
	96	44.0	1.66	0.30
Penicillium glaucum.....	12	42.5	4.31	0.31
	48	42.0	4.64	0.24
	96	42.0	4.72	0.18
Eurotiopsis Gayoni.....	12	7.0	0.80	0.16
	48	9.0	4.64	0.06
	96	9.3	4.92	0.00

Pour l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*, le pouvoir rotatoire du liquide, après avoir atteint un maximum au bout d'un certain temps de la réaction, décroît ensuite lentement. Pour l'*Eurotiopsis Gayoni*, au contraire, le maximum n'a lieu que lorsque la saccharification est terminée. On voit aussi que le rapport entre le glucose et la dextrine est variable dans les trois cas pour une même quantité de glucose produite. Par conséquent, bien que l'action diastasique conserve une allure générale qui est la même pour les trois moisissures, elle présente des particularités dépendant de l'origine de l'amylomaltase. Avec le maltose qui est un corps homogène, le dédoublement ne présente pas de différences sensibles dans les trois cas ; c'est ce qu'indique suffisamment le tableau de la page 29.

L'étude de l'influence de quelques agents physiques et chimiques sur les propriétés de l'amylomaltase, va montrer qu'il existe d'autres différences entre les trois liquides diastasifères.

*Influence de la température.* — Les expériences ont été faites entre 35° et 70° avec une différence de 5° entre chaque essai ; et l'on a vu que : 1° la température optima de l'action diffère pour chaque moisissure ; elle est de 60° pour l'*Aspergillus niger*, de 45° pour le *Penicillium glaucum*, et de 50° pour l'*Eurotiopsis Gayoni* ; 2° la température optima est la même pour l'amidon et le maltose.

On a complété ces résultats en déterminant le point où les liquides diastasifères perdent complètement leurs propriétés diastasiques. Il est voisin de 70° au maximum pour le *Penicillium glaucum*, et de 75° pour l'*Eurotiopsis*, tandis que pour l'*Aspergillus niger* le liquide diastasifère, porté à cette dernière température pendant une minute, puis ramené ensuite à 60°, peut agir encore sur l'empois d'amidon, et beaucoup moins sur le maltose. Toute activité est définitivement détruite à 80° au plus.

*Influence de l'acidité.* — L'influence de l'acidité due à l'acide tartrique se résume par les propositions suivantes : 1° pour des quantités faibles d'amylomaltase, la dose maximum d'acide tartrique que peut supporter son action pour être favorisée sans être gênée est de 0<sup>o</sup>,5 par litre dans les trois cas ; 2° l'action sur l'amidon et sur le maltose est influencée exactement de la même manière ; 3° pour l'*Eurotiopsis*, cette action, en liquide neutre, paraît être beaucoup plus faible que pour les deux autres moisissures.

*Influence de la nature de l'acide.* — Certains acides organiques, tels que l'acide acétique ou l'acide succinique, favorisent un peu plus que l'acide tartrique l'action diastasique de l'amylomaltase, tandis que l'acide oxalique produit l'effet contraire ; les différences sont légèrement accentuées pour l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*. Les acides minéraux sont supportés à des doses cinq fois plus faibles que les acides organiques ; l'acide nitrique est moins funeste que l'acide sulfurique, qui l'est lui-même moins que l'acide chlorhydrique.

En résumé, on voit par cette étude sommaire, qu'à côté de caractères communs, il existe des divergences notables dans les propriétés de l'amylomaltase issue de chacune des trois moisissures considérées. On est donc autorisé à concevoir l'existence de trois amylomaltases de nature différente, de même que, d'après les recherches de M. Fernbach<sup>1</sup>, on doit admettre que la

1. Recherches sur la sucrase (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1890).

sucrase de l'*Aspergillus* diffère de la sucrase des levures, entre lesquelles il y a encore des différences à ce point de vue.

## VII. — RÉSERVES HYDROCARBONÉES DE LA PLANTE.

Chez la levure de bière l'existence d'une réserve hydrocarbonée a été prouvée par les travaux de Pasteur<sup>1</sup>, qui l'a signalée pour la première fois, et par ceux de MM. Béchamp<sup>2</sup>, Nögeli<sup>3</sup>, Schutzenberger et Destrem<sup>4</sup>. M. Errera<sup>5</sup> a affirmé le premier qu'elle était surtout constituée par du glycogène, et cela a été confirmé par M. Laurent<sup>6</sup>. M. Bourquelot<sup>7</sup> a trouvé, depuis, que les cellules de l'*Aspergillus niger*, comme celles de beaucoup d'autres champignons, peuvent contenir du tréhalose qui disparaît pendant la fructification.

Chez l'*Eurotiopsis*, l'existence et la nature glycogénique de ses réserves hydrocarbonées, constituées aux dépens des divers hydrates de carbone étudiés précédemment, peuvent être facilement démontrées.

Prenons une moisissure jeune, au moment où elle va achever d'épuiser son liquide de culture, constitué de préférence avec un corps ne réduisant pas la liqueur de Fehling, tel que la mannite, la glycérine ou l'acide succinique, et triturons-la dans un mortier avec du sable, de façon à former une pâte homogène. Cette pâte, traitée par l'eau bouillante, donne une infusion trouble, qui, déséquée au sous-acétate de plomb, est limpide, mais reste légèrement opalescente. Le liquide, dans certains cas, réduit la liqueur de Fehling d'une façon très nette, ce qui prouve qu'il y avait très probablement dans les cellules de la plante une matière sucrée; on y reviendra tout à l'heure.

Ordinairement l'infusion de la moisissure ne réduit pas la liqueur de Fehling, mais, examinée au polarimètre, elle a toujours une rotation droite; dans un essai, j'ai trouvé + 4. 5 d. s.

1. Mémoire sur la fermentation alcoolique (*Ann. de ch. et de phys.*, t. LXVIII, 1859).

2. Sur la cause de la fermentation alcoolique par la levure de bière (*Compt. rend.*, t. LXXIV, 1872).

3. *Sitzungsber. der K. Bayer. Akad. der Wiss.*, VIII, 1878

4. Sur la composition de la levure de bière (*Compt. rend.*, t. LXXXVIII, 1874).

5. L'Epiplasme des Ascomycètes et le glycogène des Végétaux. Bruxelles, 1882.

6. Ces *Annales*, 1889.

7. Sur l'époque de l'apparition du tréhalose dans les champignons (*Jour. de pharm. et de ch.*, 5<sup>me</sup> série, t. XXVII).

Traité ensuite à l'ébullition pendant 5 minutes avec 2 0/0 d'HCl, ce liquide, ramené à son volume primitif, n'avait plus qu'une rotation de + 2 d. s. et contenait 0<sup>gr</sup>,5 0/0 de sucre réducteur qui paraissait être du glucose. Parmi les corps qui avaient pu fournir ce sucre, le plus facile à caractériser par ses réactions qualitatives, c'est le glycogène ; le liquide d'infusion, en effet, prend une teinte rouge brun très foncée avec quelques gouttes d'une solution d'iode, et la couleur disparaît à chaud pour reparaître à froid.

Au lieu d'employer l'acide chlorhydrique pour transformer les corps de réserve en sucre réducteur, on peut utiliser l'action diastasique que peut produire le liquide cellulaire de la plante, en portant simplement à l'étuve à 50° la moisissure triturée, et délayée avec de l'eau thymolisée légèrement acidulée avec de l'acide tartrique. C'est ainsi que dans un cas, le liquide, après le séjour à l'étuve, avait une rotation de + 3 d. s. et une réduction correspondant à 0<sup>gr</sup>,55 0/0 de glucose.

L'action diastasique qui s'exerce ainsi sur la réserve hydrocarbonée de la plante est évidemment celle qui préside à la disparition de la même réserve lorsque le liquide de culture est épuisé, mais les produits qu'elle engendre restent à l'intérieur des cellules ou sont utilisés à mesure qu'ils prennent naissance ; aussi, pour la mettre en évidence, il a fallu diminuer la vitalité des cellules, ou l'éteindre complètement par la trituration ou la présence d'un antiseptique.

Lorsque l'air vient à manquer dans une culture florissante d'*Eurotiopsis* nourri avec des aliments autres que les sucres, les réserves hydrocarbonées augmentent ; c'est dans ce cas que l'on peut trouver, à l'intérieur des cellules, un sucre réducteur, lorsque le liquide de culture étant près d'être épuisé, la moisissure commence à attaquer ses réserves.

Si on veut expliquer maintenant comment, malgré les propriétés diastasiques du liquide cellulaire, la plante peut former des réserves hydrocarbonées et ne les utiliser qu'à un moment donné, il faut avoir recours à l'hypothèse généralement admise, que le protoplasma des cellules, chargées spécialement d'emma-gasiner ces matériaux de réserve, ne devient capable de produire une action diastasique sur eux que dans certaines conditions physiologiques.

### VIII. — DÉGÉNÉRESCENCE CELLULOIQUE ET GRASSE DE LA PLANTE.

Dans des conditions d'existence particulières, l'enveloppe extérieure et le protoplasma des cellules de l'*Eurotiopsis* peuvent devenir le siège de phénomènes dont il va être question.

Dans un but un peu différent de celui qui a été atteint, on avait constitué, en juillet 1894, un liquide de culture avec de l'eau de levure acidulée par l'acide sulfurique à 2 grammes par litre, et contenant 4 0/0 d'alcool environ ; après stérilisation on l'avaitensemencé avec l'*Eurotiopsis*.

Une végétation très pénible, surtout au début, s'était développée et avait progressé très lentement en faisant disparaître l'alcool. A trois ou quatre reprises, espacées d'une façon assez irrégulière, on avait renouvelé la provision d'alcool en soutirant le liquide de culture, l'additionnant de nouveau de 3 à 4 0/0 d'alcool et le faisant repasser ensuite, après stérilisation, sous la moisissure. Chaque fois la plante, flétrie par le manque d'aliments, reprenait un peu de vigueur et formait de nouveaux tissus.

En décembre 1895, c'est-à-dire au bout d'un an et demi environ, la culture a été examinée et a donné des résultats qui, en partie du moins, n'ont pas encore été signalés.

Le liquide, dont l'acidité n'avait pas sensiblement varié, était un peu visqueux, presque filant ; traité par une solution d'iode, il donnait une coloration d'un bleu franc, très intense, disparaissant à chaud pour reparaitre à froid. La moisissure était gélatineuse au toucher, les tubes mycéliens étaient comme entourés d'une gaine de matière visqueuse, colorable en bleu par l'iode et soluble dans l'eau chaude.

En traitant le liquide de culture et l'infusion de la moisissure par l'alcool fort, on a obtenu un précipité blanc, d'aspect dextriniforme, qui, lavé à l'alcool et séché, avait tout à fait l'aspect de la dextrine précipitée dans les mêmes conditions. Cette matière était colorable en bleu par l'iode, et soluble dans l'eau en donnant une liqueur opalescente ; elle ne réduisait pas la liqueur de Fehling, mais était saccharifiable par les acides en donnant du glucose. La solution aqueuse indiquait assez nettement un pouvoir rotatoire droit, difficile à déterminer exactement, égal à 50° environ.

Cette matière paraît être un produit de régression de la cellulose de la moisissure, devenue soluble sous l'influence de

l'acide sulfurique du milieu de culture, et ce qui tend à le faire croire encore, c'est que cette cellulose soluble, maintenue quelque temps à l'étuve à 100°, devient en grande partie insoluble.

Pendant que se produisait cette régression de l'enveloppe cellulosique des cellules, leur protoplasma était le siège d'un phénomène analogue à la dégénérescence grasse de la levure étudiée par M. Duclaux<sup>1</sup>; mais ce dernier champignon était seul, jusqu'à présent, reconnu capable de la subir. Toutefois, il paraît se produire beaucoup plus rapidement chez l'*Eurotiopsis* que chez la levure, car dans l'espace de temps que j'ai indiqué, il s'était formé une proportion de matière grasse égale à 29,8 0/0 de moisissure séchée à 100°, tandis que pour la levure ce chiffre n'a été atteint qu'après un temps dix fois plus long.

Cette proportion de 30 0/0 de matière grasse est bien supérieure à la quantité ordinaire, 4 0/0 au maximum, que renferme la plante nourrie avec du sucre interverti : cependant il faut admettre que, même dans les conditions de vie normale, ce dernier chiffre n'est pas constant, car la moisissure développée sur l'alcool renferme une quantité double, soit 8 0/0, de matière grasse.

De sorte que, dans les conditions indiquées ci-dessus, où le champignon a consommé une quantité d'alcool environ quatre fois plus grande pour produire un poids de plante sensiblement le même que dans la vie normale, la proportion exagérée de matière grasse que contenaient les cellules pouvait bien être due simplement à une accumulation d'un produit normal de la nutrition intra-cellulaire, au lieu d'être un produit pathologique.

## DEUXIÈME PARTIE

### Action de la plante sur les matières fermentescibles pendant la vie générée.

#### I

Nous avons vu précédemment que l'*Eurotiopsis*, en consommant certains sucres fermentescibles, peut donner assez facilement de l'alcool dans les milieux où les autres moisissures

1. Nutrition intra-cellulaire (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 1889, 2<sup>e</sup> mémoire).

n'en produisent jamais. Nous considérerons maintenant le cas où la moisissure est obligée de vivre avec la quantité minimum d'oxygène, et nous étudierons son action sur les diverses matières directement ou indirectement fermentescibles qui entrent dans son alimentation.

*Sucre interverti.* — Lorsqu'on ensemence un matras Pasteur aux trois quarts plein d'un liquide nutritif contenant du sucre interverti, par exemple de l'eau de levure ou du bouillon Liebig sucrés, du moût de raisin, etc., il se produit au fond du matras un mycélium immergé qui ne tarde pas à remplacer l'oxygène dissous par de l'acide carbonique, et qui, pour peu qu'on dérange la fiole, est bientôt entraîné à la surface par de grosses bulles gazeuses. En agitant souvent le matras, on arrive à maintenir la moisissure à l'état de mycélium spumeux et gonflé de bulles d'acide carbonique, en tout semblable à un mycélium de mucor cultivé dans les mêmes conditions.

Il faut dire cependant que la végétation a toujours une tendance à devenir aérienne ; si on reste plusieurs jours sans agiter le matras, on voit immédiatement apparaître des tubes aériens formant une couche blanche à la surface du mycélium.

La proportion d'alcool que l'on peut obtenir dans ces conditions est assez importante, puisqu'elle dépasse souvent 8 0/0, et correspond à 14 0/0 environ de sucre disparu au bout d'un temps variable, mais qui ne dépasse guère un mois et demi ; le pouvoir ferment, qui est le rapport du poids du sucre décomposé au poids de plante produite, varie alors de 20 à 30.

Bien que l'action de l'*Eurotiopsis* sur le sucre soit comparable à celle des levures alcooliques, ce champignon ne peut en aucun cas produire la fermentation avec un manque aussi complet d'air que ces dernières.

Ensemencé dans un liquide convenable dont la surface est couverte d'une couche d'huile pour empêcher les échanges gazeux avec l'atmosphère extérieure, le développement est presque nul et il n'y a pas de dégagement gazeux. Si la plante, développée au contact de l'air, est ensuite submergée, et que, pour empêcher l'accès de l'air, on ferme le vase avec un tube de dégagement plongeant sous le mercure, dès que l'oxygène a disparu dans l'atmosphère emprisonnée, on ne voit plus se former de bulles d'acide carbonique autour du mycélium.

Dans ces conditions d'existence, la plante ne trouve donc

pas, dans la décomposition du sucre, une somme d'énergie suffisante pour sa vie active, puisqu'il faut nécessairement une certaine quantité d'oxygène libre venant de l'extérieur.

Pendant cette vie générée, l'*Eurotiopsis* ne subit dans aucun cas un changement morphologique important analogue à celui que l'on connaît pour les mucors.

En suivant, à l'aide du saccharimètre et de la liqueur de Fehling, la marche d'une fermentation de sucre interverti, on obtient les chiffres suivants :

DATES	ROTATION saccharim.	GLUCOSE 0/0. — a.	LÉVULOSE 0/0. — b.	RAPPORT $\frac{a}{b}$
		gr.	gr.	
20 mai. Liquide primitif.	— 26,3	7,02	7,08	0,99
27 — 1 <sup>er</sup> Essai . . . . .	— 11,5	6,55	5,00	1,31
29 — 2 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2,0	5,98	3,63	1,64
4 <sup>er</sup> juin. 3 <sup>e</sup> — . . . . .	+ 4,5	3,69	1,57	2,35
6 — 4 <sup>e</sup> — . . . . .	+ 3,0	1,59	0,56	2,84

L'examen de ces chiffres montre que le lévulose disparaît plus vite que le glucose; il y a donc fermentation élective, et l'élection est l'inverse de celle que nous avons constatée pour la combustion du même mélange sucré.

Rien n'est plus contingent, en effet, que cette propriété élective qui varie avec la plus grande facilité suivant les conditions physiologiques du développement de la plante.

*Glucose et lévulose seuls.* — On ne constate pas de différence bien sensible entre le glucose et le lévulose fermentant isolément et parallèlement.

*Lactose interverti.* — Avec ce mélange sucré, on a une fermentation un peu plus difficile qu'avec les sucres précédents; elle s'arrête lorsque la proportion d'alcool atteint 4 à 5 0/0. En suivant le procès de cette fermentation, on trouve qu'il ne paraît pas y avoir de préférence pour l'un des sucres, pas plus qu'il n'y en a lorsqu'ils disparaissent par combustion complète, et cependant l'un des sucres est plus résistant que l'autre.

*Galactose.* — Le galactose seul, en effet, fermente bien plus difficilement que lorsqu'il est mélangé au glucose; la production d'alcool s'arrête à 2 ou 3 0/0, encore faut-il que la vie de la plante soit partiellement aérienne.

*Maltose.* — Quand on veut faire fermenter le maltose par l'*Eurotiopsis*, il faut prendre une couche florissante de moisissures, remplacer le liquide épuisé par un liquide neuf, et agiter le vase de culture au moins une fois par jour pour mouiller la surface extérieure de la couche de moisissure et la submerger le plus possible. Le sucre disparaît alors rapidement et presque uniquement par fermentation.

En matras Pasteur, la proportion d'alcool ne dépasse guère 1 à 2 0/0 avec un développement partiellement aérien.

Comme dans la vie largement aérienne, la présence du glucose favorise considérablement le dédoublement du maltose, car un mélange des deux sucres à proportions égales fermente en entier comme s'il n'y avait que du glucose.

La fermentation du maltose est encore facilitée par un mélange de dextrine qui subit elle-même la fermentation après transformation en glucose. La dextrine seule fermente même beaucoup mieux que le maltose seul, en laissant cependant un résidu très difficile à attaquer; on peut obtenir une proportion d'alcool voisine de 5 0/0. Le moût de bière, constitué essentiellement par un mélange de maltose et de dextrine, fermente encore mieux que ce même mélange fait artificiellement, et la quantité d'alcool que l'on obtient est très supérieure à celle que donne la levure de bière, justement à cause de la fermentation de la dextrine.

Ainsi, un moût de bière qui contenait 65 grammes de sucre réducteur calculé en maltose, et 96 grammes de glucose après saccharification par HCl, a donné, en fermentant avec l'*Eurotiopsis*, 4,6 0/0 d'alcool, tandis qu'avec une levure basse, on en a obtenu 3,4 0/0 seulement<sup>1</sup>.

*Lactose.* — Si on submerge sous une solution de lactose une couche florissante de moisissures développée sur ce sucre, on voit se produire, assez lentement, 2 à 3 0/0 d'alcool, sans qu'on puisse saisir un dédoublement du lactose. En matras Pasteur, la résistance de ce sucre à la fermentation est encore plus grande que celle du maltose.

## II

Les produits principaux de la fermentation alcoolique produite par l'*Eurotiopsis* sont les mêmes que ceux fournis par les levures, c'est-à-dire l'alcool éthylique, l'acide carbonique, la

1. Résultats analogues à ceux obtenus par MM. Gayon et Dubourg avec le *mucor alternans* (*Ann. de la science agronomique française et étrangère*, t. I, 1887).

glycérine et l'acide succinique. Quant aux quantités de chacun de ces corps que l'on obtient, les moyennes d'un très grand nombre d'essais sont les suivantes pour 100 grammes de sucre interverti décomposé :

Alcool .....	46.4
Acide carbonique .....	44.4
Acide succinique.....	2.3
Glycérine .....	1.8
	<hr/>
	94.9

Si on ajoute maintenant à ce total le poids de plante produite qui varie de 4 à 5 0/0, on voit que l'on approche très près du sucre décomposé.

En comparant ces chiffres à ceux que Pasteur a obtenus avec la levure de bière, qui sont les suivants :

Alcool .....	48.6
Acide carbonique .....	46.8
Glycérine .....	3.2
Acide succinique.....	0.6
Cellulose et autres matières.....	1.2
	<hr/>
	100.4

On voit qu'il y a des différences notables : la quantité de sucre qui fournit l'acide carbonique et l'alcool est plus faible dans le premier cas que dans le second, tandis que celle qui donne la glycérine et l'acide succinique est à peine plus importante ; toutefois le rapport des poids respectifs de ces deux derniers corps est très différent. Il y a donc une quantité plus grande de sucre employé à former de la matière organisée avec l'*Eurotiopsis* qu'avec la levure, comme l'indiquent les poids différents des cellules vivantes produites.

Ces différences prouvent encore une fois ce qui a été dit par Pasteur<sup>1</sup>, que l'équation d'un phénomène chimique d'ordre vital, comme la fermentation alcoolique, doit être essentiellement variable avec la nature de l'organisme qui le produit.

#### CONCLUSIONS

Comme beaucoup de moisissures de sa famille, telles que l'*Aspergillus niger* ou le *Penicillium glaucum*, l'*Eurotiopsis Gayoni*

1. *Etudes sur la bière*, Paris, 1875.

se cultive sur des milieux artificiels ; la composition minérale du liquide Raulin lui convient très bien, ainsi que sa composition azotée, laquelle s'est montrée supérieure à toutes les autres sources d'azote minéral ou organique qui ont été essayées.

Sa nutrition hydrocarbonée, comparée à celle de l'*Aspergillus niger* qui est la mieux connue, présente des différences notables. Certains corps, tels que l'alcool éthylique, la glycérine, la mannite, le lactose, qui ne sont des aliments pour l'*Aspergillus niger* que lorsqu'il est arrivé à l'état adulte, sont parfaitement utilisés par l'*Eurotiopsis* au moment de la germination des spores. Par contre, le saccharose, qui convient particulièrement à l'*Aspergillus niger*, et l'inuline, sont complètement exclus de l'alimentation de l'*Eurotiopsis*.

En étudiant la valeur alimentaire comparative des divers aliments de cette plante, on a vu que ce sont les sucres directement assimilables qui fournissent, par jour, le rendement moyen maximum, un peu supérieur à celui que l'on obtient avec l'*Aspergillus niger* cultivé dans les conditions indiquées par Raulin.

Les aliments indirectement assimilables utilisés par l'*Eurotiopsis* ne sont consommés qu'après avoir subi une transformation diastasique analogue à celles qu'ils subissent de la part des autres cellules vivantes susceptibles de se nourrir des mêmes aliments. La connaissance de ce fait important et des produits de ces transformations physiologiques est donc confirmée une fois de plus pour la plupart des aliments considérés ; pour le lactose, son dédoublement préalable en glucose et galactose par une action diastasique qui le rend assimilable par une moisissure, se trouve démontré ici pour la première fois avec certitude.

D'une manière générale, quel que soit l'aliment hydrocarboné qui lui a donné naissance, on peut manifester, en dehors de la vie de la plante, avec son liquide de culture ou son liquide cellulaire, toutes les actions diastasiques qu'elle exerce en se développant aux dépens de ses aliments hydrocarbonés indirectement assimilables. Ce qui est vrai pour l'*Eurotiopsis* s'applique très probablement de même à beaucoup d'autres champignons inférieurs.

Si l'on considère la grande variété des transformations diastasiques que les moisissures peuvent produire, il est bien difficile d'admettre que la présence d'une substance spéciale, d'une

diastase possédant une individualité propre, est la cause de chacune de ces transformations.

Pour concilier cette hypothèse avec les faits déjà connus, d'abord ceux établis par M. Fernbach pour la sucrase et ceux que j'ai indiqués pour l'*amylomaltase*, il faudrait qu'une même diastase présentât une double physionomie : la première dépendant de la nature de l'aliment à transformer, la seconde dépendant de la variété de la plante qui la produit. Or, ce ne sont pas là les caractères d'un corps chimiquement défini.

On ne s'explique pas bien non plus, dans cette hypothèse, qu'une même transformation diastasique soit influencée d'une façon différente par les agents physiques ou chimiques, et qu'elle présente un caractère spécial à ce point de vue, pour chaque plante d'où elle dérive.

Dans la nutrition hydrocarbonée de l'*Eurotiopsis*, comparée à celle de l'*Aspergillus niger*, on trouve encore une différence assez importante. Avec ce dernier champignon, lorsque l'oxygène de l'air fait défaut, on voit apparaître l'acide oxalique<sup>1</sup> comme produit intérimaire de la combustion, tandis qu'avec l'*Eurotiopsis* on ne le retrouve jamais. Mais, dans ces conditions, la nutrition hydrocarbonée de celui-ci subit une déviation qui se traduit par la fermentation alcoolique du sucre.

En exagérant les conditions où sa vie est gênée par la température et le manque d'oxygène, la plante arrive à produire des quantités d'alcool supérieures à celles que l'on obtient avec les levures de *mucor* ou de certains *saccharomyces*, sans que sa constitution morphologique subisse une transformation importante.

L'*Eurotiopsis* est donc un trait d'union plus parfait que les autres champignons connus entre les moisissures qui sont de purs agents de combustion et les levures dont le rôle principal est de produire la fermentation alcoolique du sucre. Le caractère ferment chez l'*Eurotiopsis* est d'ailleurs d'une élasticité remarquable, car il peut varier facilement de 1 à 10.

1. M. Duclaux, *loc. cit.*

# FIXATION DE L'AZOTE LIBRE PAR LE BACILLE DES NODOSITÉS DES LÉGUMINEUSES

PAR M. MAZÉ

(Travail du Laboratoire de chimie agricole à l'Institut Pasteur.)

---

La fixation de l'azote libre par les légumineuses portant des nodosités sur leurs racines n'est plus contestée nulle part : le point sur lequel les savants ne sont pas encore d'accord, c'est sur le mécanisme de cette fixation. L'explication serait bien simple si le bacille des nodosités était capable d'emprunter à l'atmosphère de l'azote gazeux. Mais toutes les tentatives faites pour démontrer l'existence de cette propriété sont restées à peu près stériles. Elles n'ont abouti qu'à démontrer la fixation de quantités d'azote très minimes, dépassant de très peu, dans les cas les plus favorables, les limites des erreurs d'expérience. De sorte qu'en désespoir de cause on s'est arrêté à cette explication vague que la fixation d'azote résulte d'une symbiose de la plante et de la bactérie.

Ce mot *symbiose* est un mot *abstrait* qu'on met à la place des notions concrètes que la science ne possède pas. S'il a par lui-même une signification, il ne peut vouloir dire autre chose que ceci : si on fournit à la bactérie, en quantité et en qualité, tout ce que la plante lui donne, cette bactérie devra se comporter en cultures artificielles comme elle le fait sur la plante, et si c'est elle qui fixe l'azote, elle devra aussi fixer ce gaz dans un matras où on la cultive.

C'est au moins à cette conception que m'a conduit la *Revue critique* que M. Duclaux a publiée dans ces *Annales* (1894, p. 728), et dans laquelle il mettait en regard du travail négatif nécessaire pour l'organisation de l'azote gazeux, les travaux positifs fournis par certaines matières alimentaires que le microbe fixateur d'azote était obligé de consommer. Il n'y avait, pour mettre cette idée en œuvre, qu'à chercher, dans les documents

publiés, quels étaient les besoins alimentaires du bacille des nodosités.

En réfléchissant à ce sujet, il m'a paru qu'on avait fait erreur au sujet de l'alimentation en azote de ce bacille. Sous prétexte qu'il est capable d'assimiler cet azote sur les racines de la plante, on ne le lui a d'ordinaire fourni qu'à l'état gazeux dans la culture artificielle, ou encore à l'état de sels ammoniacaux ou d'asparagine. Pourquoi le contrarier lorsqu'on veut l'interroger sur ses fonctions physiologiques ? Dans la plante, il trouve une matière albuminoïde toute faite dès l'origine, et il suffit qu'il puisse contribuer à l'augmenter. Conformément à ce point de vue, on pouvait essayer de le cultiver en présence d'une matière albuminoïde, de légumine de préférence, et de voir si le poids total d'azote combiné dans la culture est plus grand à la fin qu'au commencement.

S'il fixe de l'azote, il doit, conformément aux résultats de M. Winogradsky, et aux idées développées par M. Duclaux, détruire de la matière hydrocarbonée.

Il est difficile de savoir celle que lui fournit la plante ; mais on peut, dans les cultures artificielles, se contenter du saccharose, dont Frank, Laurent, Beyerinck ont constaté l'action bienfaisante. Ils l'ont seulement employé un peu timidement, les premiers à la dose de 1 0/0, M. Beyerinck à la dose de 2 0/0 dans ses derniers essais. Il semble qu'on puisse augmenter ces doses, si la destruction d'une certaine quantité de sucre est la rançon de l'organisation d'une certaine quantité d'azote.

Enfin l'oxygène semble non moins nécessaire pendant la durée de la culture. La bactérie des nodosités en trouve constamment dans le sol, et sa forme rameuse, la forme ramifiée, aplatie, striée des nodosités semble attester ce besoin d'oxygène.

Ceci conduisait à essayer des cultures en surface sur des milieux solides, et j'ai par ce moyen obtenu en effet, comme on va le voir, en quatre jours, à la température de la chambre au mois de juillet, des cultures d'une richesse incomparable. L'épaisseur du dépôt muqueux dans les tubes verticaux à gélose inclinée atteint 1,5 à 2 c. c. en 8 jours.

Le bouillon dont je me suis servi provenait d'une infusion à 100° de haricots blancs pendant une demi-heure. J'évitais de pousser jusqu'à la cuisson, pour que la féculle ne se répandît pas

dans le liquide. Ce bouillon contenait environ 5 dix-millièmes d'azote. On y ajoutait 2 0/0 de saccharose, 1 0/0 de chlorure de sodium et des traces de bicarbonate de soude.

Le bouillon précédent, solidifié par l'addition de 15 0/0 de gélose, est réparti en couches très minces sur le fond plat de grands vases, de 20 à 22 cm. de diamètre.

L'épaisseur de la gélose varie de 0 à 4 millimètres, car le fond est généralement un peu convexe en dedans.

Ces vases, bien connus des bactériologistes, sont munis d'un goulot vertical de 2 à 3 centimètres de diamètre, avec étranglement; une petite tubulure latérale, horizontale, placée à 1 centimètre environ au-dessus du fond, permet de faire passer sur les cultures un courant d'air continu; j'espérais par ce moyen parvenir à exalter l'activité du microbe, en satisfaisant largement à ses besoins d'oxygène. Plusieurs vases, rendus solidaires les uns des autres par des tubes de caoutchouc, étaient placés sur un même courant d'air produit par un aspirateur d'une capacité de 11 litres.

Il est bien évident qu'il fallait prendre la précaution de purger cet air de toute trace d'azote combiné; dans ce but, on lui faisait traverser:

1<sup>o</sup> Un tube de verre peu fusible, rempli de tournure de cuivre sur une longueur de 30 cm. à peu près, et modérément chauffé au-dessous du rouge sombre de façon à ne pas produire un appauvrissement sensible de l'air en oxygène; comme les nitrates se trouvent sous forme de poussières cristallines dans l'atmosphère, on en interceptait la plus grande partie par une longue bourre d'amiante placée en avant du cuivre;

2<sup>o</sup> Un tube à ponce sulfurique destiné à absorber l'ammoniaque libre, qui est le composé azoté le plus important de l'atmosphère, surtout de celle des laboratoires où on fume et où il s'en forme constamment pendant la combustion du gaz;

3<sup>o</sup> Un barboteur à eau qui avait pour but de saturer l'air de vapeur d'eau, afin d'éviter la moindre évaporation dans les vases de culture.

Le dernier de ces vases était en communication directe avec l'aspirateur. Celui-ci était réglé de façon à débiter 20 litres par 24 heures, sans compter le renouvellement plus rapide de l'atmosphère des cultures qui se pratiquait tous les matins, afin de la débarrasser des produits gazeux de la respiration

accumulés pendant la dernière partie de la nuit, à la faveur d'une circulation trop lente causée par une diminution de pression dans l'aspirateur. Cette précaution se justifiait également par l'absorption sensible d'oxygène provoquée par un contact trop prolongé de l'air avec le cuivre chauffé.

Je dois noter aussi la façon dont je faisais l'ensemencement des vases, car il n'est pas facile de recouvrir une si grande surface de gélose d'une couche uniforme de germes si l'on ne veut pas y introduire une quantité sensible d'eau; j'ai obtenu un résultat très satisfaisant à l'aide d'une pipette à étranglement munie d'une effilure aussi fine que possible, et dont l'extrémité était tordue en demi-tour de spire; c'était en somme un petit pulvériseur; la pression nécessaire était fournie par une poire en caoutchouc; en imprimant à la pipette un mouvement de rotation, on recouvrira la surface de la gélose d'un nuage de gouttelettes liquides; l'ensemencement pouvait se faire de cette façon par la tubulure horizontale, ce qui permettait d'éviter toute chance de contamination.

EXPÉRIENCE I. — Le 2 juillet, trois vases ont été ensemencés; le 4, la surface de la gélose était recouverte d'une couche régulière de microbes, à surface glacée caractéristique; au bout de quatre jours, le mucus était déjà très abondant; le développement, à la température de la chambre oscillant entre 20 et 25°, se faisait très vite.

Après dix jours, la surface de la gélose était recouverte d'une couche de mucosité dont l'épaisseur était remarquable; le courant d'air semblait exercer sur le développement du bacille une influence très favorable. A partir du 12<sup>e</sup> jour, l'aspect ne change plus; l'expérience est arrêtée le 17 juillet; elle avait duré 15 jours, la culture examinée au microscope se montre pure; le mucus est peu visqueux, mais d'une consistance épaisse; les bâtonnets sont courts, gros, et se colorent difficilement, même par la fuchsine; les cultures ne montrent pas de jeunes bacilles bien colorés; les matières nutritives du milieu devaient être bien épuisées. Pour vérifier la pureté des cultures, j'ai ensemencé quelques tubes de gélose afin d'examiner les organismes jeunes; trois jours après, ces tubes présentaient l'aspect caractéristique des cultures; le microscope montrait des bâtonnets irréguliers, avec une extrémité légèrement renflée.

Les dosages de l'azote avant et après l'expérience ont été faits par le procédé Kjeldahl, la masse liquéfiée était aspirée dans des ampoules de verre à paroi très mince, tarées d'avance, d'une contenance de 7 à 8 c. c.; on les remplissait à 1/2 c. c. près, puis on en fermait les deux extrémités à la lampe; pesées à nouveau, on les introduisait dans les ballons où devait se faire l'attaque par l'acide sulfurique; l'ampoule présentait toujours du côté du goulot la bulle d'air emprisonnée; on la brisait en appliquant sur cette bulle l'extrémité d'un agitateur en verre, rougie à la flamme.

Puis on évaporait à quelques gouttes au bain de sable, à une température inférieure à 100°; le petit volume de liquide restant était reporté sur les parois du ballon par agitation, et s'évaporait presque en totalité pendant le refroidissement du ballon; l'attaque se faisait en présence d'une goutte de mercure; l'acide sulfurique employé avait été vérifié par une opération à blanc.

Voici les résultats fournis par l'analyse, pour la première expérience; ils ne sont pas l'expression d'une moyenne de plusieurs analyses; mais bien les chiffres de plusieurs opérations concordantes.

Azote initial dans les trois vases.....	62mgr 1
Azote final.....	102 9
GAIN D'AZOTE.....	40mgr 8

Rapport de l'azote gagné à l'azote initial = 2/3 environ. Il eût été très intéressant de déterminer par l'analyse la quantité de sucre consommé; mais j'ai craint de saccharifier une partie de la gélose par l'action de l'acide employé pour intervertir le saccharose; en supposant que tout le sucre a été transformé, soit 3 gr. 75, le rapport de l'azote gagné au sucre détruit est  $\frac{40,8}{3075} = 0,013$ , à peu près.

Ce rapport évalué ainsi un peu prématurément nous servira plus loin, lorsque de nouvelles expériences nous permettront de le considérer comme à peu près rigoureux, c'est-à-dire, lorsque nous nous serons convaincus que, dans la durée de l'expérience, tout le sucre introduit a été consommé.

EXPÉRIENCE II. — Dans le cours de l'expérience précédente, je me suis demandé s'il ne s'était pas produit une déperdition

d'azote sous forme d'ammoniaque entraînée par le courant d'air. Les cultures du bacille des légumineuses dans du bouillon de haricot exhalent une forte odeur, qui n'est pas sans analogie avec celle que dégagent les fromages à pâte molle (brie et camembert).

Je connaissais depuis longtemps cette odeur; mais, dans ces cultures en grande surface et à circulation d'air, elle était devenue tellement pénétrante que des doutes me vinrent sur sa nature. Y avait-il de l'ammoniaque dans les gaz recueillis dans l'aspirateur? L'hypothèse n'a rien d'invraisemblable; un grand nombre de microbes aérobies transforment les matières albuminoïdes en ammoniaque. Le bacille des légumineuses pouvait à la rigueur en faire tout autant. Cette observation exigeait l'interposition d'un barboteur à acide sulfurique entre le dernier vase de culture et l'aspirateur.

Une deuxième expérience fut donc mise en train avec cette seule modification, le 25 juillet; le 26, le développement est manifeste; il marche activement, comme dans la première expérience; la quantité de mucosité formée est également surprenante; le 9 août, on a mis fin à l'expérience, elle a duré 15 jours.

L'analyse du liquide du barboteur n'a pas donné de traces d'ammoniaque; ce résultat était d'ailleurs à prévoir, car l'odeur du gaz sortant de la culture n'était pas sensiblement modifiée par l'acide sulfurique; cette analyse a constitué en somme une vérification nouvelle des réactifs et des appareils.

La quantité de gélose répartie dans deux vases était de 175 gr. 238; l'analyse a fourni :

Azote initial.....		70mgr7
Azote final .....	418	2
AZOTE GAGNÉ.....		47mgr5

$$\frac{\text{Azote initial}}{\text{Sucre initial}} = \frac{70,7}{3.504,7} = \frac{1}{50}$$

$$\frac{\text{Azote gagné}}{\text{Sucre consommé}} = \frac{47,5}{3.504,7} = 0,013 \text{ à peu près.}$$

$$\frac{\text{Azote gagné}}{\text{Azote initial}} = \frac{47,5}{70,7} = \frac{2}{3} \text{ environ.}$$

Le rapport de l'azote initial au sucre consommé n'est vrai que sous la réserve indiquée précédemment. Cet inconvénient,

inhérent à la gélose, joint à celui qui résulte de l'emploi d'amoules de verre pour effectuer les pesées, constituaient un défaut de méthode et une difficulté de manipulation qu'il fallait éviter.

Les milieux liquides, seuls, peuvent permettre de les tourner, car il ne fallait pas songer à la gélatine.

Les milieux liquides, je l'ai dit, ne m'avaient pas fourni, dans mes essais avec des tubes ordinaires, des résultats comparables à ceux que j'avais obtenus avec de la gélose; le dépôt formé lentement au fond des tubes, dans un liquide dont l'épaisseur variait de 4 à 5 c.c., semblait inerte; on aurait dit un dépôt de matière amorphe; cependant j'ai vu dans la suite qu'en prenant la précaution de ne jamais agiter les tubes, on obtient des résultats identiques à ceux que je vais exposer dans l'expérience suivante. Pendant que la plus grande partie des microbes tombe au fond des tubes, quelques-uns se maintiennent à la surface et se disposent en cercle contre la paroi, dans cette partie du liquide qui s'élève par capillarité le long du verre; ils s'y multiplient et forment peu à peu une membrane continue qui recouvre toute la surface du bouillon; il faut attendre au moins quinze jours pour obtenir cette membrane; mais la plus petite secousse la submerge; elle se disloque et tombe peu à peu au fond, pour ne plus se reformer; lorsqu'elle se maintient à la surface, elle s'épaissit rapidement et forme une sorte de bouchon à surface luisante, régulière; le liquide sous-jacent devient visqueux, épais, peu coulant; il reste cependant hyalin, transparent; quelques rares flocons presque imperceptibles s'y maintiennent en suspension. D'où provient cette viscosité du liquide? Évidemment d'une élaboration particulière au bacille des légumineuses, et non de l'action d'une diastase quelconque sur le sucre du bouillon, car le liquide qui surnage le dépôt formé au fond des tubes dans les cultures dépourvues de membrane reste fluide et très coulant. On ne peut attribuer ces résultats qu'à une aération plus ou moins parfaite.

M. Laurent<sup>1</sup> du reste, avait déjà préconisé l'emploi de couches minces de liquide, 3 ou 4 millimètres tout au plus; il avait vu qu'en prenant cette précaution on favorisait le développement du bacille. Mais pour se mettre à l'abri de l'azote combiné de l'air, il recommande d'effiler les tubulures du récipient

1. Ces *Annales*, 1892.

de culture ; c'était une précaution nuisible, car dans ces conditions, l'aération se faisait mal ; mais cet inconvénient n'existait plus dans les expériences que j'allais tenter, car j'avais adopté la disposition qui m'avait déjà donné des résultats si encourageants ; seul le barboteur à acide sulfurique, dont la présence était inutile, avait été supprimé.. . . . .

**EXPÉRIENCE III.** — Le 7 août, deux vases reçoivent chacun 50 c. c. de bouillon de haricot additionné des substances suivantes :

Sucre.....	2,6	o/o
Chlorure de sodium.....	4	
Bicarbonate de soude.....	traces.	

Dès le premier jour le liquide se trouble ; puis le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> jour, il se forme un dépôt qui constitue bientôt une membrane, adhérant légèrement au fond ; le 5<sup>e</sup> jour, la mucosité est tellement épaisse dans les parties les moins profondes du liquide, qu'elle forme un bourrelet visiblement plus élevé que le niveau du liquide ; ce bourrelet n'obéit pas aux mouvements imprimés au vase ; il gagne les parties les plus profondes qui se gélatinisent peu à peu pour se figer à leur tour vers le 13<sup>e</sup> jour ; le 15<sup>e</sup> jour toute la masse est presque solide ; elle coule péniblement, lorsqu'on incline les vases ; son aspect, d'un blanc grisâtre, rappelle celui de la vaseline ; la surface est régulière, glacée.

Le 23 août 1896, on met fin à l'expérience ; la culture se diffuse facilement dans l'eau ; aucune trace de membrane ne subsiste après une légère agitation.

Les résultats de l'analyse pour les deux vases réunis sont les suivants :

Azote initial .....	22	mgr	4
Azote final .....	45		8
AZOTE GAGNÉ.....			23mgr 4

Rapport de l'azote gagné à l'azote initial :

$$\frac{23,4}{22,4} = 1,04.$$

Rapport de l'azote initial au sucre initial :

$$\frac{22,4}{2600} < 0,01.$$

Rapport de l'azote gagné au sucre initial.

$$\frac{23,4}{2600} < 0,01$$

Dans l'espace de 16 jours, tout le sucre avait été consommé ; nul doute que dans les cultures sur milieu solide, le même résultat était atteint lorsqu'on a mis fin à l'expérience ; nous pouvons donc maintenant considérer les rapports établis comme tout à fait rigoureux.

#### CONCLUSIONS

Les résultats précédents réalisent d'un bout à l'autre les espérances que j'avais formulées *a priori*. Les bacilles des légumineuses placés dans un milieu convenable qui rappelle d'aussi près que possible les conditions naturelles qu'ils trouvent dans les nodosités, se développent d'une façon surprenante et remplissent leur fonction si importante de la fixation de l'azote libre de l'atmosphère.

Le symbiose n'est plus nécessaire pour expliquer la fixation de l'azote libre de l'atmosphère par le microbe des nodosités ; cette propriété lui appartient en propre, indépendamment de l'influence exercée par la plante. Il ne naît point du concours de ces deux êtres une force nouvelle dont l'action est nécessaire pour faire entrer l'azote libre dans les composés organiques ou organisés, et l'hypothèse adoptée jusqu'ici pour expliquer le mécanisme de la symbiose, exposée avec tant de netteté par M. Duclaux (*loc. cit.*), reste entière et reçoit la consécration de l'expérience. La plante héberge un être et lui fournit les hydrates de carbone et l'azote organique dont il se nourrit ; il y puise en même temps l'énergie nécessaire pour fixer l'azote libre qu'il doit mettre, comme le dit M. Nobbe, sous une forme assimilable pour le végétal.

Les insuccès auxquels on a été conduit jusqu'ici dans les nombreux essais que l'on a tentés dans cette voie, sont dus prin-

cipalement à un défaut de méthode et à une évaluation trop superficielle de l'énergie nécessaire pour permettre au bacille des nodosités de faire entrer l'azote atmosphérique dans une combinaison endothermique. Placer cet organisme dans un milieu privé d'azote combiné revient à l'obliger à se nourrir aux dé-dé de l'azote atmosphérique ; c'est lui demander un surcroît de travail qu'il n'est pas capable de fournir.

Il faut avant tout qu'il assure son existence et qu'il se multiplie aux dépens d'une réserve toute préparée, tout comme la plante vit aux dépens des ressources accumulées dans les cotylédon-s en attendant qu'elle ait formé les organes qui lui permettront de prendre ses aliments dans le sol et dans l'air.

Les jeunes cellules une fois formées, se paieront le luxe d'un travail facultatif, à condition qu'elles trouvent dans les milieux de culture un excès d'hydrate de carbone qui fournira de l'énergie pour faire la synthèse des composés quaternaires.

On voit que la dose de sucre ne peut guère tomber au-dessous de 2 0/0, car les expérimentateurs qui ont opéré avec des milieux renfermant 1 0/0 de sucre seulement, n'ont pas constaté d'enrichissement sensible en azote.

L'accès facile de l'air exerce également une influence très favorable sur la fixation de l'azote, et cela se comprend, car la rapidité de la combustion du sucre est en relation avec la quantité d'oxygène fourni aux cultures. C'est parce qu'il n'a pas rempli cette condition d'aération que M. Beyerinck n'a observé qu'une fixation trop faible pour être affirmatif. Nous reviendrons plus tard sur le rôle de l'air.

Pour le moment, il nous reste à présenter quelques observations sur les rapports que nous avons établis entre l'azote gagné et le sucre initial fourni aux cultures.

Dans l'expérience III, ce rapport est un peu inférieur à 1 0/0 ; si les mêmes conditions étaient réalisées dans la plante, celle-ci devrait fournir au bacille un poids d'hydrate de carbone 100 fois plus grand que le poids de l'azote total qui fait partie de ses tissus à la fin de son développement ; autrement dit, la plante devra fournir au bacille 100 grammes d'amidon pour recevoir en échange 1 gramme d'azote :

Une plante peut-elle suffire à ce travail ? Cette question reste sans réponse, en ce qui concerne les légumineuses ; car nous

n'avons aucun moyen d'évaluer l'énergie disparue, par la combustion des hydrates de carbone, qu'en tablant sur l'un des rapports que nous avons établis ; ce serait une façon bien grossière de trouver la quantité d'hydrate de carbone que la plante doit produire, et non celle qu'elle peut produire. Mais nous pouvons procéder par comparaison avec la betterave à sucre, pour laquelle les éléments de notre rapport sont connus. Une bonne betterave à sucre renferme en moyenne 1,40 0/0 de matières azotées solubles et insolubles; et 14 0/0 de saccharose. On sait qu'on peut passer de l'azote total à la protéine brute en multipliant le chiffre fourni par l'analyse par le facteur 6,25. Faisons ici l'opération inverse ; elle est loin d'être rigoureuse ; mais nous opérons sur des moyennes ; nous obtenons ainsi pour l'azote total de la betterave 0,224 0/0.

Le rapport de l'azote total au sucre est donc :

$$\frac{0,224}{14} = 0,016$$

Ce chiffre est un peu supérieur à celui qui nous a été fourni par l'expérience III; mais il y a des betteraves dans lesquelles le sucre atteint 18 à 20 0/0 du poids de la racine.

On voit donc que la betterave pourrait facilement emprunter son azote à l'atmosphère pendant sa seconde année si, comme dans les légumineuses, une cause étrangère venait transformer dans ce sens toute l'énergie qu'elle peut accumuler.

Les légumineuses ne possèdent pas d'autre réserve d'hydrates de carbone que celle qui se trouve dans les graines ; mais elles sont particulièrement riches en azote, et maintenant nous pouvons affirmer qu'elles peuvent, aussi bien que la betterave sucrière, emprunter aux radiations solaires l'énergie nécessaire pour fabriquer, par l'intermédiaire des bacilles, toute la matière azotée qui entre dans leurs tissus : le rapport de la surface foliaire au poids total de la plante dans le trèfle ou la luzerne par exemple, est certainement tout aussi élevé que celui que fournit la betterave ; la durée de végétation des légumineuses est en outre plus longue que celle de la betterave ; la température minima à laquelle cette végétation se manifeste est encore en faveur des légumineuses.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU BACILLE TYPHIQUE

PAR MM. P. REMLINGER ET G. SCHNEIDER

MÉDECINS AIDES-MAJORS

(Travail du laboratoire de bactériologie du Val-de-Grâce).

## I

Le bacille typhique existe-t-il dans la nature, en dehors de l'homme malade et des produits qui en émanent? Cette question n'est pas dénuée d'intérêt au point de vue de l'étiologie générale de la fièvre typhoïde.

La dothiéntérite n'est assurément pas une maladie dont la cause parasitaire s'entretient uniquement par passages à travers l'organisme humain. Par son ubiquité, sa fréquence, sa permanence dans les centres urbains de tous les pays, et divers attributs épidémiologiques, elle se rapproche plutôt de certaines affections, également ubiquitaires et communes (pneumonie, diphtérie, etc.) dont le germe, sans doute dispersé dans les milieux ambients, habite souvent l'une ou l'autre de nos cavités naturelles. Aussi a-t-on pensé que l'agent de la fièvre typhoïde devait être plus répandu dans la nature qu'on ne le suppose d'habitude et que même, à l'instar du pneumocoque, du streptocoque, du bacille diphtéritique, etc., il pouvait exister dans les cavités digestives de l'homme sain. Cette hypothèse, émise par le professeur Kelsch dans ses cours et ses écrits, développée dans son enseignement par le professeur Vaillard, leur a paru seule propre à interpréter d'une manière rationnelle l'ensemble des faits épidémiologiques. Il importait donc de la vérifier, car de sa confirmation peut dériver quelque éclaircissement sur les points encore obscurs de l'étiologie.

Rechercher le bacille typhique dans les milieux extérieurs ou les cavités naturelles de l'homme sain était naguère une

tâche malaisée, sinon vouée à un échec presque certain. La difficulté principale résultait de la coexistence habituelle du bacille d'Eberth et du *bacterium coli* dans les matières examinées, et de l'impossibilité presque absolue de séparer ces deux microbes avec la technique et les milieux proposés.

Cependant Lösener<sup>1</sup>, en utilisant la gélatine additionnée de 3 à 5 dix-millièmes d'acide phénique, avait rencontré dans l'intestin d'un porc, dans un échantillon de terre, dans les matières fécales d'un homme sain, enfin dans l'eau de son laboratoire, un bacille qu'il ne pouvait différencier du bacille typhique. En présence de ces faits, il reconnaissait la nécessité d'une enquête plus générale et plus approfondie.

Dans un récent mémoire<sup>2</sup>, Elsner a fait connaître un procédé simple et efficace pour l'isolement du bacille typhique des produits où il se trouve mélangé à des bactéries diverses, y compris le *coli*-bacille. Appliqué par son auteur et divers bactériologistes (Lazarus, Brieger, Chantemesse) à l'étude des selles des typhoïdiques, le procédé d'Elsner donne des succès presque constants. Un progrès notable était dès lors réalisé.

Munis de cette technique, nous avons, sur les conseils et sous la direction de M. le professeur Vaillard, entrepris de rechercher l'existence du bacille typhique dans différents milieux extérieurs, les eaux, le sol et aussi le tube digestif de sujets non atteints de fièvre typhoïde.

Avant de mentionner les résultats obtenus, nous indiquerons sur quels fondements ils s'appuient.

## II

Le milieu d'Elsner se compose d'un mélange, en proportions définies, de macération de pomme de terre, de gélatine et d'ioduré de potassium. Sa réaction doit être légèrement acide.

D'après Elsner, le *coli*-bacille et le bacille d'Eberth s'y développent à l'exclusion des autres germes, avec des caractères très différents qui permettent de distinguer facilement leurs colonies respectives. Les colonies du bacille typhique sont petites, trans-

1. LÖSENER. *Arbeiten aus der kaiserlichen Gesundheitsamte*, 1893.

2. ELSNER. *Untersuchungen über electives Wachsthum der bacterium-Coli Arten und des Typhusbacillus und dessen diagnost. Verwerthbarkeit*, *Zeitschr. f. Hyg.*, 1896.

parentes, à peine visibles, celles du *bacterium coli* sont au contraire plus grandes et opaques ; les premières n'apparaissent que vers le quatrième jour, les secondes, plus hâties, dès le deuxième.

Les qualités attribuées par Elsner à la gélatine iodurée ne sont pas aussi absolues qu'il l'estime dans son mémoire. Diverses bactéries autres que le *B. coli* et le bacille d'Eberth s'y développent et le liquéfient, comme l'ont déjà signalé MM. G. Roux, Rödet, et Grimbert. D'autre part, les caractères des colonies colibacillaires ou Eberthiques ne sont pas toujours aussi différenciés qu'Elsner l'a décrit. Certaines colonies punctiformes, transparentes, sont constituées par une variété de *coli*, voire même des coccus ; par contre, des colonies opaques peuvent offrir dans les cultures tous les caractères du bacille typhique. Elsner<sup>1</sup> a dû reconnaître, d'ailleurs, que son milieu n'avait aucune propriété spécifique pour la différenciation du *bacterium coli* et du bacille d'Eberth. Ces réserves faites, il n'en reste pas moins que l'emploi de la gélatine iodurée est un excellent moyen de recherche si, n'accordant à l'aspect macroscopique des colonies qu'une importance relative, on s'attache à étudier indistinctement toutes celles qui se développent à la surface d'une plaque, à l'exception, bien entendu, des espèces liquéfiantes : c'est en procédant de la sorte qu'on utilisera le mieux les avantages du procédé<sup>2</sup>.

*De la diagnose du bacille typhique.* — Dans l'impossibilité actuelle de reproduire expérimentalement chez l'animal la fièvre typhoïde de l'homme, la diagnose du bacille typhique repose sur un ensemble de caractères dont la réunion est nécessaire pour conclure à une identification légitime.

Lösener, a basé son diagnostic sur les caractères suivants :

1<sup>o</sup> Aspect caractéristique des cultures sur gélatine. ;

2<sup>o</sup> Vive mobilité des bacilles et variations de forme dans des milieux de culture favorables ;

1. Congrès de médecine interne de Berlin, 1896.

2. En raison de leur extrême petitesse, les colonies formées par le bacille typhique sont souvent difficiles à prélever pour les ensemencements. La prise en est facilitée par l'emploi d'une très petite curette métallique qui enlève le bloc de gélatine sur lequel repose la colonie choisie.

Les colonies ainsi transportées dans le bouillon pour l'étude ultérieure donnent parfois naissance à des cultures mélangées. L'isolement des espèces est facile par un nouvel emploi du milieu d'Elsner.

- 3<sup>o</sup> Grand nombre de cils ;
- 4<sup>o</sup> Non coloration par le procédé de Gram ;
- 5<sup>o</sup> Culture, sans dégagement de gaz, dans des milieux additionnés de sucre de raisin, de lait ou de canne ;
- 6<sup>o</sup> Culture dans le lait, sans coagulation ;
- 7<sup>o</sup> Absence d'indol dans les cultures ;
- 8<sup>o</sup> Réaction acide des cultures dans le petit-lait (le degré d'acidité ne doit pas dépasser 30/0 si l'on emploie la solution normale de soude à 1/10) ;
- 9<sup>o</sup> Identité de développement sur une pomme de terre dont une des moitiés est ensemencée avec un bacille d'Eberth éprouvé, et l'autre avec le bacille étudié ;
- 10<sup>o</sup> Culture tardive dans la solution normale de Maasse<sup>1</sup> additionnée de glycérine ;
- 11<sup>o</sup> Action pathogène.

A ces caractères d'ordre courant, et que nous avons invariablement recherchés, il convient d'en ajouter d'autres : 1<sup>o</sup> l'inaptitude à se développer sur un milieu de culture où le bacille typhique a déjà vécu (Chantemesse et Widal<sup>2</sup>), 2<sup>o</sup> et surtout, le mode d'action du sérum des animaux immunisés contre le bacille typhique (action agglutinante sur les cultures, action préventive contre l'infection).

### I. ACTION AGGLUTINANTE DU SÉRUM.

Les modifications que subissent les cultures du bacille d'Eberth lorsqu'on les additionne d'une petite quantité de sérum antityphique, ont été données, depuis le travail de Gruher et Durham, comme un moyen de distinction de ce microbe ; leur importance a acquis plus de notoriété depuis que Widal a appliqué au diagnostic de la dothiénentérite les propriétés agglutinantes du sérum des sujets atteints de cette affection.

Cette réaction de l'agglutination a été surtout recherchée au moyen du sérum d'un cheval immunisé contre le bacille typhique par M. le D<sup>r</sup> Chantemesse<sup>3</sup>.

Chaque épreuve portait simultanément sur les cultures du

1. Asparagine, acide malique, chlorure de sodium, etc.

2. *Archives de Physiologie*, 1887.

3. Ce sérum, très actif, déterminait, à très faible dose, une agglutination rapide et remarquable des cultures du bacille typhique.

bacille à étudier, celles d'un bacille d'Eberth authentique et du *bacterium coli*, toutes faites dans le même milieu et placées dans des conditions identiques. Ces différentes cultures étaient additionnées d'une dose égale du même sérum : deux gouttes pour 6 à 8 c. c. d'une culture de 24 heures. L'addition de sérum était faite soit dans une culture de quarante-huit heures, soit dans le bouillon avant l'ensemencement. Etaient seules considérées comme susceptibles d'identification avec le bacille typhique les cultures qui, présentant tous les autres caractères requis, réagissaient exactement comme lui sous l'influence du sérum employé.

En outre, du jour où M. Widal<sup>1</sup> eut fait connaître l'action agglutinante du sérum des typhoïdiques, l'épreuve était simultanément faite, dans les conditions indiquées, avec le sérum d'un typhoïdique et le sérum provenant du cheval immunisé. Dans ce cas, il était constant de voir que les cultures étudiées réagissaient d'une manière conforme : tantôt nettement agglutinées par les deux sérums, tantôt également indifférentes à l'un et à l'autre.

Quelle valeur convient-il d'attribuer à cette épreuve ? Diverses observations tendent à établir que des microbes différents peuvent être agglutinés par le même sérum. Max Gruber et Durham<sup>2</sup> signalent que le *bacillus enteridis* de Gaertner, microbe faisant fermenter la lactose, est agglutiné par un sérum typhique concentré; d'où cette conclusion que si les résultats négatifs de la réaction ont une valeur diagnostique réelle, il n'en est plus de même des résultats positifs. D'après Rodet<sup>3</sup>, le sérum antityphi que agglutine les cultures du coli-bacille. Petruschky<sup>4</sup> rencontre dans les selles des typhoïdiques une bactérie (*B. faecalis alcaligenes*) que le sérum agglutine, mais qui se distingue essentiellement du bacille d'Eberth par l'alcalinité de ses cultures. Bordet<sup>5</sup> remarque que le sérum du cheval neuf, mélangé à une émulsion de vibrios cholériques, de bacilles du tétanos, du bacille typhique et du *bacterium coli*, produit énergiquement la réunion en amas de ces microbes. Enfin Gilbert et Fournier<sup>6</sup>, puis Achard et Ben-

1. 26 juin 1896. — Société Méd. Hôpitaux.

2. MAX GRUBER ET DURHAM. — *Münch. medic. Wochenschrift*, 31 mars 1896.

3. Société de Biologie, 25 juillet, 1896.

4. *Centralblatt für Bacteriologie*, février 1896.

5. *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1896.

6. *Bull. Acad. de médecine*, 20 octobre 1896.

sauve<sup>1</sup> mentionnent que le bacille de la psittacose, ou maladie des perruches infectieuses, est agglutiné par le sérum typhique. Ainsi un sérum banal agit sur des bactéries nettement différenciées, et des microbes différents sont actionnés par un même sérum spécifique. Ces faits montrent évidemment que l'action d'un sérum ne se limite pas exclusivement à un microbe déterminé ; mais, s'ils paraissent de nature à subordonner l'importance de l'épreuve, ils ne l'affirment cependant pas. Un sérum agglutine des cultures différentes dans des conditions particulières, et cesse d'agir si ces conditions sont modifiées. Ainsi Gruber et Durham ont soin de faire remarquer que si le *B. enteridis* est agglutiné par une quantité relativement considérable de sérum, il ne l'est plus lorsqu'on fait agir une dose minima, qui impressionne toujours le bacille typhique. Widal et Sicard spécifient le même fait au sujet du bacille de la psittacose ; aussi établissent-ils<sup>2</sup> que dans l'emploi du sérum pour le diagnostic microbiologique, l'essentiel n'est pas de rechercher les conditions dans lesquelles un même sérum agglutine deux microbes d'espèces voisines, mais bien les circonstances dans lesquelles l'agglutination diffère et peut servir au diagnostic différentiel. Ce moyen est fourni, comme l'indiquent ces auteurs, par l'emploi de la dose minima de sérum qui suffit pour actionner nettement le bacille typhique, et, dans ce cas, on doit reconnaître que, jusqu'ici, l'épreuve du sérum fournit un excellent procédé de différenciation. C'est cette dose minima qui a toujours été utilisée dans nos recherches.

L'épreuve de l'action agglutinante du sérum acquiert plus de valeur encore lorsqu'elle s'ajoute à la suivante, dont l'importance paraîtra plus décisive.

## II. — ACTION PRÉVENTIVE DU SÉRUM D'UN CHEVAL IMMUNISÉ.

Le sérum d'un cheval immunisé contre le bacille typhique préserve contre l'infection par ce microbe ; cette action est réellement spéciale et paraît n'appartenir jusqu'ici à aucun autre sérum. Si donc un bacille présentant tous les caractères morphologiques et biologiques du bacille d'Eberth, doué en outre de propriétés pathogènes pour les animaux, devient inoffensif pour

1. Soc. méd. Hôpit., 27 novembre 1896.

2. Société de Biologie, 28 novembre 1896.

eux lorsqu'on leur injecte préalablement une faible dose de sérum antityphique, il doit être permis de trouver dans ce fait une preuve quasi décisive en faveur de la nature éberthienne du microbe envisagé.

La diagnose a toujours été terminée par cette épreuve, du moins pour les bacilles doués de propriétés pathogènes, car tous ne la possèdent pas. Cette épreuve était faite avec le sérum provenant d'un cheval immunisé, dont une faible dose ( $1/4$ ,  $1/8$  de c. c., préservait sûrement les cobayes contre l'injection intra-péritonéale de 2 c. c. d'une culture en bouillon de bacille typhique extrait de la rate.

L'expérience portait simultanément sur trois animaux : 1<sup>o</sup> le témoin ; 2<sup>o</sup> un cobaye traité par un c. c. de sérum de cheval neuf ; 3<sup>o</sup> un cobaye traité par  $1/2$ , un  $1/4$  ou  $1/8$  de c. c. de sérum antityphique. Tous étaient éprouvés par l'injection intra-péritonéale de 2 c. c. de la culture du bacille à l'étude. De ces animaux devait seul survivre celui qui avait reçu le sérum antityphique.

C'est seulement après avoir réuni cet ensemble de caractères utilisables dans l'état actuel de nos connaissances que nous nous sommes crus autorisés à conclure l'identité d'un bacille avec le bacille d'Eberth.

### III

#### I. — LE BACILLE TYPHIQUE DANS LES EAUX POTABLES.

Les recherches ont porté sur trente-sept échantillons d'eau (puits, source, rivière) recueillis soit en temps d'épidémie, soit en l'absence de toute manifestation typhoïdique : neuf d'entre eux renfermaient un bacille présentant tous les caractères du bacille typhique.

Deux échantillons provenaient de villes où la fièvre typhoïde régnait au moment du prélèvement (Meaux, Saint-Omer). La présence du bacille d'Eberth ne fut, dans ces deux cas, que transitoire; de nouveaux échantillons, recueillis un mois plus tard, alors que la fièvre typhoïde avait disparu, ne contenaient plus le bacille typhique.

Six autres étaient envoyés de villes (Châteaudun, Dijon) où la fièvre typhoïde avait sévi quelque temps auparavant, mais n'existaient plus épidémiquement aux divers moments, assez espacés

les uns des autres, où les échantillons d'eau furent prélevés. Ces deux faits méritent quelques détails.

*A. Eau de Châteaudun.* — Une épidémie de fièvre typhoïde se manifeste pendant l'hiver de 1895-1896 dans la population civile et surtout dans la population militaire de Châteaudun. Les deux groupes font usage de la même eau.

Un premier examen de l'eau consommée est pratiqué le 21 janvier par le procédé des milieux phéniqués. La présence du bacille typhique n'est pas constatée.

Une deuxième analyse est effectuée le 15 mars par la méthode d'Elsner; elle permet de déceler l'existence d'une bactérie rigoureusement identique au bacille typhique.

Troisième analyse le 10 mai. Constatation du bacille typhique.

Quatrième analyse le 13 juin. Constatation du bacille typhique.

Or, dès le début de mars, l'épidémie avait pris fin, et, aux périodes ultérieures, la maladie ne se manifestait plus que par des cas rares et isolés.

*B. Eau de Dijon.* — Pendant l'hiver de 1895-1896, épidémie de fièvre typhoïde commune à la population civile et militaire. Les deux groupes consomment la même eau.

Divers examens de l'eau pratiquée en 1895 et au début de 1896 par le procédé des milieux phéniqués restent négatifs au point de vue de l'existence du bacille typhique. Les échantillons analysés paraissent si peu riches en germes qu'ils peuvent être classés dans la catégorie des eaux pures.

En avril 1896, à un moment où la fièvre typhoïde semble ne plus exister dans la ville, l'analyse de l'eau par la méthode d'Elsner y démontre la présence d'une bactérie identique au bacille d'Eberth.

Même constatation en mai et en juin, périodes où, semble-t-il, la dothiénentérite avait cessé d'être observée dans les deux groupes de la population. Les examens ultérieurs pratiqués en juillet, août et septembre ont été négatifs.

Dans les deux premiers faits cités (Meaux, Saint-Omer), le bacille typhique est trouvé dans l'eau de boisson au moment où la dothiénentérite règne; il disparaît avec celle-ci : la coïncidence n'a rien de surprenant. Dans les deux autres (Châteaudun, Dijon), le bacille typhique n'est pas rencontré pendant l'évolution épidémique (on ne peut conclure à son absence, vu l'imperfection des méthodes d'analyse), mais il se trouve et se maintient dans l'eau distribuée pendant les trois mois qui suivent la cessation de la maladie. Ainsi le bacille typhique existe dans une eau régulièrement consommée sans que la fièvre typhoïde se produise parmi les groupes qui l'utilisent; la circonstance paraîtra, à bon droit, singulière. Il importe de mentionner que cette

bactérie était trouvée dans une eau que l'analyse chimique et la très faible teneur en germes conduisaient à considérer comme très pure.

## II. — LE BACILLE TYPHIQUE DANS LE SOL.

Treize échantillons de terre et de poussière, provenant d'endroits différents, ont été examinés. Sept fois, l'analyse a permis d'isoler un bacille présentant tous les caractères du bacille d'Eberth :

1<sup>o</sup> Dans les matériaux de déblai d'une cour de caserne (Vitré) où s'étaient produits quelques cas de dothiénentérite ;

2<sup>o</sup> Dans les poussières recueillies sur le plancher du laboratoire de bactériologie du Val-de-Grâce ;

3<sup>o</sup> Dans l'entrevois d'une chambre de caserne (Cahors), en l'absence de toute manifestation typhoïdique ;

4<sup>o</sup> Dans quatre échantillons de terre, soit superficielle, soit profonde (un mètre), recueillis dans les cours et jardins du Val-de-Grâce.

De ces bacilles, trois étaient pathogènes pour les animaux.

## III. — LE BACILLE D'EBRETH DANS LE TUBE DIGESTIF DE L'HOMME NON ATTEINT DE FIÈVRE TYPHOÏDE.

Nos recherches ont porté sur les matières fécales de dix sujets traités à l'hôpital pour des affections qui n'avaient rien de commun avec la fièvre typhoïde ; chez cinq d'entre eux l'examen a révélé l'existence d'un bacille absolument identique au bacille d'Eberth, savoir :

a) Dans un cas de leucémie à évolution fébrile avec diarrhée intermittente. Les selles liquides, examinées à quinze jours d'intervalle, ont donné chaque fois un résultat positif. L'examen de la salive a été, par contre, négatif.

b) Dans un cas de tuberculose aiguë, sans lésions intestinales. (Observation rapportée par M. le professeur agrégé Lemoine à la Société médicale des Hôpitaux<sup>1</sup>).

c) Chez un sujet atteint de troubles intestinaux prémonitoires d'une dysenterie aiguë.

1. Société Médic. des hôpitaux, 31 juillet 1896.

*d)* Enfin chez deux paludéens chroniques, ne présentant pas de symptômes intestinaux.

Aucun de ces malades n'avait eu la dothiéntérie à une époque antérieure.

Des cinq bacilles extraits des matières fécales, quatre étaient pathogènes pour le cobaye. L'injection préventive du sérum antityphique préservait les animaux contre l'infection.

#### IV

Indépendamment des bacilles précédents, nous avons maintes fois rencontré dans les eaux, le sol, et l'intestin de l'homme, des bactéries qui présentent avec le bacille d'Eberth la plus grande ressemblance, mais s'en distinguent par l'absence de propriétés pathogènes pour les animaux, et l'indifférence à l'égard du sérum spécifique ; ce sérum n'agglutine pas leur culture.

Afin de ne rien préjuger, nous les mentionnons à part, sans toutefois mettre en doute leur étroite parenté avec l'agent pathogène de la fièvre typhoïde. Les caractères de forme, de culture, de biologie sont identiques de part et d'autre ; les différences portent uniquement sur la virulence et la manière de réagir à l'égard du sérum. Mais la virulence est un attribut contingent, susceptible d'augmentation ou de disparition, que l'on développe ou supprime presque à volonté, et dont la signification, en l'espèce, n'a rien d'absolu. Quant à l'insensibilité de ces bactéries vis-à-vis d'un sérum donné, elle ne fournit pas de base plus légitime à une différenciation radicale. Admettre avec certains savants que le résultat négatif d'une épreuve par le sérum suffit à trancher la nature d'une bactérie qui, par ailleurs, se superpose au bacille typique, serait quelque peu exagéré si on se réfère à l'histoire bien connue du vibron cholérique. Tous les vibrions étudiés en ces dernières années ne se sont pas montrés égaux devant le sérum de Pfeiffer, et, cependant, il s'agissait bien de vibrions nettement cholérigènes, capables de provoquer le choléra typique chez l'homme et chez l'animal. C'est que l'espèce vibrionienne comporte des variétés multiples, offrant toutes un air de famille, sous la diversité des traits individuels ; le sérum obtenu par l'immunisation d'un animal contre telle variété peut n'être pas complètement efficace contre la variété voisine. Il est

dès lors loisible de supposer que des faits du même ordre se reproduisent à propos du bacille typhique. L'espèce bacille d'Eberth comprend peut-être des variétés plus ou moins nombreuses, qui ne réagissent pas semblablement sous l'influence du sérum d'un animal immunisé contre une variété déterminée.

La croyance à l'invariabilité des types chez les microbes pathogènes est aujourd'hui quelque peu ébranlée par des faits multiples ; la question de races, issues peut-être d'une souche commune, mais différenciées ensuite par des vicissitudes inconnues, acquiert une importance que l'on ne saurait méconnaître. Pourquoi cette notion, reconnue vraie pour certaines bactéries pathogènes, ne s'appliquerait-elle pas au bacille typhique ? Nous inclinons à croire que les bacilles non pathogènes et indifférents au sérum qui ont été rencontrés dans les eaux, le sol, etc., ne sont en définitive que des variétés du bacille typhique : du moins la parenté est évidente, si l'identité n'est pas absolue. Cette diversité possible dans le type fondamental servira peut-être à expliquer les modalités variables de l'infection typhique, que l'on commence à entrevoir.

Si l'interprétation des faits qui viennent d'être relatés est exacte, il en résultera la notion suivante. Le bacille typhique est répandu dans la nature, en dehors de l'homme malade ; il se rencontre dans les eaux potables, le sol, le tube digestif des sujets non atteints de fièvre typhoïde, et, sans doute, fait normalement partie de la flore microbienne des milieux qui nous entourent. Cette notion n'est en rien subversive des données acquises sur l'étiologie générale de la fièvre typhoïde, elle sert au contraire à la mieux concevoir et permet de comprendre bien des faits qui, sans ce secours, resteraient inexplicables.

Les observations de tous les jours, recueillies surtout dans les milieux ruraux, ont mis en relief la part de la contagion dans la formation et l'extension de certains foyers épidémiques : leur valeur subsiste. Les recherches modernes ont démontré le rôle primordial des eaux impures dans le développement et la propagation de la maladie : la solidité des preuves défie toute contestation. Mais il s'en faut que tous les cas relèvent de la contagion ou de l'ingestion d'eau souillée par les déjections des typhoïsants. Maintes fois, la maladie éclate chez des sujets ou sur des groupes déprimés par la fatigue, le surmenage, les pri-

vations, etc., ou bien après l'ingestion d'aliments avariés, sans qu'il soit possible d'incriminer à l'origine la contagion ou l'usage d'une eau notoirement contaminée. Et même dans les cas où l'eau potable paraît être le plus justement en cause, il est souvent impossible d'établir comment et par où une souillure fécale a pu lui arriver. Ces faits se concevront plus aisément avec la notion de la banalité du germe typhique, qui admet sa dispersion dans les milieux ambients et sa présence éventuelle dans nos cavités naturelles. Une eau réputée pure peut le véhiculer. Ainsi introduit dans l'organisme, il y vivra inoffensif jusqu'au jour où une circonstance déprimante, une aide fortuite, résultant peut-être d'une association microbienne, lui ouvrira carrière.

Cette banalité du germe typhique, sa présence plus ou moins fréquente dans les cavités naturelles, soulèvera la question des conditions propres à favoriser éventuellement son action pathogène. Sur ce point, on ne peut émettre que des hypothèses. Mais en présence du rôle indéniable des eaux impures dans la genèse de la maladie, on doit se demander si leur mode d'action n'est pas diversifié, les unes véhiculant le germe typhique, les autres transportant certaines bactéries qui, peut-être, favorisent la pululation du bacille déjà présent dans le tube digestif.

Cette conception n'est point faite pour diminuer l'importance des eaux potables dans l'étiologie de la fièvre typhoïde.

---

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ANGINES A FAUSSES MEMBRANES

---

## LES ANGINES A BACILLE DE FRIEDLÄNDER

PAR

M. CHARLES NICOLLE

M. A. HÉBERT

Chef du laboratoire de bactériologie de l'Ecole  
de Médecine de Rouen.

Préparateur du laboratoire.

Depuis le mois de novembre 1894, un service public de diagnostic des affections pseudo-membraneuses, organisé par nous, fonctionne au laboratoire de bactériologie de l'Ecole de médecine de Rouen. Nous y avons pratiqué en deux ans plus de seize cents examens de fausses membranes. Ces examens ont tous été faits par l'ensemencement en tubes de sérum coagulé; toutes les fois que cela a été possible, nous avons pratiqué en même temps l'examen direct des fausses membranes.

Dans huit cas, nous avons obtenu sur sérum coagulé des colonies de bacilles de Friedländer, six fois à l'état de pureté, deux fois associé au bacille diphtérique. Nous parlerons seulement en terminant de ces deux derniers cas dont un seul a pu être suivi. Sur les six cas de la première catégorie, cinq ont été étudiés complètement par nous. Ils nous ont permis de reconnaître l'existence d'une forme particulière d'angines à fausses membranes non décrite jusqu'à ce jour. A la description clinique de cette affection, nous joignons dans cette note les quelques renseignements que nous a fournis une étude bactériologique complète des divers échantillons de bacilles de Friedländer isolés de ces angines.

MM. les D<sup>rs</sup> Gargam et Delabost ont droit à nos remerciements pour les renseignements cliniques qu'ils ont bien voulu nous fournir, ou nous mettre à même de recueillir dans trois de ces cas.

## I

## ÉTUDE CLINIQUE DES ANGINES A BACILLE DE FRIEDLÄNDER

1<sup>o</sup> *Symptômes.* — Nous donnons à la fin de cet article un bref résumé des observations que nous avons recueillies<sup>1</sup>. En dehors des cinq cas observés par nous, un seul, croyons-nous, a été signalé jusqu'à ce jour; il est dû au Dr Max Stooss (*Annales suisses des Sciences médicales*, 1895, série III, livre I). C'est avec ces six observations que nous allons essayer d'esquisser l'aspect clinique des angines à bacilles de Friedlænder.

Les angines à bacilles de Friedlænder paraissent pouvoir revêtir deux formes, l'une chronique qui nous paraît assez nette, l'autre subaiguë ou aiguë, qui l'est certainement bien moins.

*La forme chronique* est la plus fréquente. Quatre de nos observations appartiennent à cette forme. Elle se caractérise objectivement par les symptômes suivants :

Sur les amygdales ordinairement, quelquefois sur les piliers, ou la paroi pharyngée, se voient de petits points blanc nacré ou jaunâtres, mamelonnés, de 1 à 5 millimètres de large. Leur bord est net: leur nombre variable; il est rare qu'ils forment par leur union une fausse membrane d'étendue un peu importante. Ces petits points sont très adhérents à la muqueuse; lorsqu'on tente de les enlever, on ne parvient généralement qu'à en détacher les parties superficielles: il faut employer la curette pour les avoir entièrement. La muqueuse sous-jacente est villeuse, saignante. Les fausses membranes détachées se reproduisent avec une certaine rapidité. Elles ne se désagrègent nullement dans l'eau: le terme de fausses membranes peut donc leur être légitimement appliqué.

Aucun symptôme général n'accompagne ces lésions. Comme signes fonctionnels locaux, le plus souvent on ne note rien; tout au plus, dans certains cas, observe-t-on un léger chatouillement ou une faible sensation de gêne pharyngée.

La durée de l'affection est particulièrement longue dans cette forme. Elle s'est prolongée pendant plusieurs mois dans les cas que nous avons suivis; il est probable qu'elle peut durer davantage.

1. Pour tous les détails cliniques consulter la thèse de M. Hébert, Paris, 1896, sur les angines à bacilles de Friedlænder.

*La forme aiguë ou subaiguë* est bien moins nette. Nous ne possédons pour la décrire que deux observations, l'une, celle de Max Stooss, tout à fait incomplète; l'autre, qui nous est personnelle et qui ne lui est point comparable.

Les symptômes locaux paraissent identiques à ceux de la forme chronique; il n'existe point non plus de symptômes généraux. Dans l'observation de Max Stooss, les fausses membranes eurent une durée de trois jours; dans la nôtre, elles se prolongèrent un mois, et il y eut de plus un érythème généralisé qui ne fit, peut-être, que coïncider avec l'angine.

2<sup>o</sup> *Diagnostic clinique.* — On comprend facilement que le diagnostic clinique d'une affection aussi rare ne soit guère aisé. Il a été fait néanmoins par M. le Dr Gargam, auquel nous devons la connaissance de deux de ces cas, lorsque le hasard le mit en présence de la seconde de ces malades. Et, de fait, ce diagnostic nous paraît possible, du moins dans la forme chronique: la persistance des fausses membranes, leur adhérence aux parties profondes, coïncidant avec l'absence de tout symptôme général ou fonctionnel, devront toujours y faire penser. Le diagnostic bactériologique donnera seul évidemment une certitude.

L'angine à bacille de Friedlænder sera plus souvent méconnue que confondue. Nous avons vu, dans la plupart des cas observés par nous, le diagnostic se poser entre elles et les angines à fausses membranes autres, diphtériques ou non. Cependant il n'existe guère d'analogie entre ces affections. Mais la présence d'une fausse membrane alarme toujours à juste raison le médecin, même en l'absence de symptômes généraux.

Parmi les maladies chroniques de la gorge, deux seulement nous paraissent pouvoir être confondues avec les angines à bacille de Friedlænder, ce sont les amygdalites folliculaires et l'affection décrite sous le nom de pharyngomycose leptothrixique<sup>1</sup>.

Les amygdalites folliculaires sont faciles à reconnaître: il n'existe point de fausses membranes; les cryptes de la glande contiennent une substance caséuse que la pression en fait sortir.

La pharyngomycose leptothrixique est une affection mal connue au point de vue clinique, comme au point de vue étiologique. Cliniquement elle ressemble beaucoup aux angines à

1 · En particulier Thèse Colin, 1893, Paris.

bacille de Friedlænder, et il nous paraît impossible d'en faire le diagnostic ; bactériologiquement elle serait due au développement du *leptothrix buccalis*. Les auteurs qui l'ont étudiée à ce point de vue ont noté dans l'exsudat la présence de cet organisme, dont ils ont fait la cause de la maladie. Le *leptothrix buccalis* étant un hôte normal de la bouche, et sa présence étant de règle dans toutes les fausses membranes, quelle qu'en soit la cause, il est difficile d'admettre comme prouvé qu'il est l'agent spécifique de cette affection. D'ailleurs, l'étude bactériologique de la pharyngomycose n'a été faite jusqu'ici que d'une façon très incomplète ; on s'est borné simplement à faire des examens de frottis et jamais il n'a été fait de cultures.

Nous pensons, pour notre part, que, si des ensemencements sur sérum coagulé étaient pratiqués, un certain nombre des cas de pharyngomycose tout au moins rentrerait dans la classe des angines à bacille de Friedlænder. Il y a là, en tout cas, un point intéressant, que de nouvelles recherches ne peuvent manquer d'éclaircir.

3<sup>e</sup> *Diagnostic bactériologique.* — L'examen bactériologique, avons-nous dit, donne seul un diagnostic certain. On peut, si l'on veut, pratiquer l'examen direct des fausses membranes. Dans ce cas, on emploiera successivement une méthode de coloration simple et la méthode de Gram. On reconnaîtra, dans l'immense majorité des cas, le bacille de Friedlænder à ses caractères morphologiques, sa capsule, sa non coloration par la méthode de Gram. Mais il arrive souvent que ce microbe n'est point en nombre prédominant dans le *frottis* : d'autres microorganismes d'importance secondaire ou nulle, des cocci divers, des *leptothrix* surtout, peuvent être, par contre, très abondants. Il sera donc utile de faire un ensemencement.

En pratique, nous recommandons d'avoir recours d'emblée à ce procédé et de négliger l'examen direct. Le meilleur milieu de culture pour le diagnostic rapide est le sérum coagulé. On fera donc purement et simplement un ensemencement sur ce milieu, aujourd'hui d'un emploi courant pour le diagnostic de la diphtérie. En quinze à vingt heures on obtiendra, s'il s'agit d'une angine à bacilles de Friedlænder, des colonies assez grosses, arrondies, grisâtres, visqueuses, faciles à reconnaître à l'œil nu, et qu'un examen microscopique montrera constituées par

le bacille de Friedlænder. Généralement, il ne pousse sur sérum dans ces cas, en dehors des colonies de ce microorganisme, que de rares colonies de cocci, colonies qu'on rencontre constamment dans toutes les angines. Dans un cas, nous avons trouvé un pneumocoque non virulent pour la souris.

Nous avons pratiqué dans deux cas, après inclusion dans la paraffine, des coupes de fausses membranes. Nous nous sommes rendus compte de la disposition des éléments divers dont elle est composée. Superficiellement, on trouve disposés sans ordre des débris cellulaires (épithélium ou globules blancs), de la fibrine en grains, des bacilles de Friedlænder et des paquets de leptothrix ; plus profondément la fibrine est disposée sous la forme d'amas d'où partent des filaments anastomosés déterminant par leur union la formation de petites loges que remplissaient des bacilles de Friedlænder. La muqueuse congestionnée se montre en dessous.

4<sup>e</sup> *Angines à bacilles diphthériques et de Friedlænder associés.* — Nous n'avons noté que deux cas d'association de ces deux micro-organismes, et l'un d'eux n'a pu être suivi. Dans le seul cas étudié, l'angine a été des plus bénignes, sans symptômes généraux pour ainsi dire. L'apparition des fausses membranes a été précédée par un œdème considérable de la luette et des amygdales. Les fausses membranes sont restées limitées à ces organes, sans tendance à l'extension ; la malade, il est vrai, a été traitée par le sérum dès le début de l'affection. Les fausses membranes ont mis plusieurs jours à disparaître, et ne l'ont fait que peu à peu. (Voir l'observation à la fin de l'article.)

On ne peut tirer aucune conclusion générale d'une observation isolée, nous nous contenterons de noter simplement deux faits qui ont été remarqués dans ce cas et qui se rencontrent dans les angines à bacilles de Friedlænder pur : la *bénignité* extrême et la *persistence* des fausses membranes.

## II

### ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES BACILLES DE FRIEDLÆNDER ISOLÉS DE CES ANGINES

1<sup>o</sup> *Procédé d'isolement.* — Pour obtenir à l'état de pureté les divers échantillons de bacilles de Friedlænder trouvés par nous

dans les angines, nous avons eu recours à l'inoculation à la souris blanche. Une trace de culture sur sérum coagulé, inoculée à cet animal, a toujours amené sa mort en dix-huit à soixante heures.

Le sang du cœur recueilli purement et aussitôt que possible après la mort nous a donné généralement des colonies pures. Nous n'avons jamais négligé cependant de faire l'isolement sur plaque de gélatine, en diluant dans ce milieu une trace de sang provenant de la souris. Ces précautions ne sont point inutiles, car, sans doute à cause de la viscosité de sa capsule, le bacille de Friedländer est plus difficile à isoler que les autres microbes.

Nous appellerons F1, F2, F3, F4, F5, F6, les six échantillons isolés par nous, l'indice de la lettre F indiquant le numéro de l'observation clinique.

**2<sup>o</sup> Caractères morphologiques.** — Les six échantillons de Friedländer se sont montrés morphologiquement très analogues à ceux décrits jusqu'à ce jour par les auteurs, en particulier par M. Grimbert<sup>1</sup>. Nous leur avons reconnu les caractères classiques, absence de coloration par la méthode de Gram, polymorphisme, immobilité, absence de spores.

Le polymorphisme des espèces étudiées par nous a toujours été très grand dans les cultures; à côté des formes courtes cocco-bacillaires, nous avons trouvé des formes longues, même des formes filamenteuses dans tous les cas, sauf F6. Dans le sang de la souris, le polymorphisme fait défaut, il n'existe que des formes courtes.

De même que M. Grimbert, nous avons vu très nettement la capsule sur tous les milieux de culture.

**3<sup>o</sup> Cultures.** — Les caractères de culture sont sensiblement ceux décrits par les auteurs :

*En bouillon de viande*, en 24 heures, trouble léger et voile visqueux, surtout marqué sur les bords du tube auquel il est adhérent, donnant ainsi l'image d'un anneau qui, au bout de quelques jours, tombe au fond. La culture devient visqueuse à la longue.

1. GRIMBERT, *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 novembre 1895, *Société de biologie*, 13 mars 1895; *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 décembre 1896.

*En gélatine par piqûre*, culture en clou typique, pas de liquéfaction.

*Sur gélose*, traînée épaisse, visqueuse.

*Sur sérum coagulé*, culture identique à celle sur gélose, mais plus abondante encore; au bout de 2 à 3 jours la culture coule presque entièrement au fond du tube.

*Sur pomme de terre*, culture abondante, épaisse, avec dégagement de bulles (sauf F6).

*Sur carotte*, culture abondante avec bulles pour F4 et F5, abondante sans bulles pour F6, peu abondante et sans bulles pour les autres échantillons.

*Dans le lait*, culture dans tous les cas. Coagulation par F3 en 6 jours, par F1 en 8 jours, par F2 en 12 jours. Pas de coagulation, même en un mois et malgré trois passages successifs par F4, F5 et F6.

*En solution de peptone*. Pas d'indol même au bout d'un mois.

4<sup>e</sup> Fermentation des sucres. — M. Grimbert a le premier bien étudié les fermentations des divers sucres produites par le bacille de Friedländer.

Pour faire cette étude, il s'est servi du milieu suivant :

Sucre fermentescible.....	3 grammes.
Peptone sèche.....	2 —
Eau.....	400 —
Carbonate de chaux.....	q.s.

Il a divisé, au point de vue des fermentations, les divers échantillons de bacille de Friedländer étudiés jusqu'à ce jour en trois groupes.

Dans le premier groupe est rangé l'unique échantillon étudié par Frankland. Cet échantillon fait fermenter la glucose, l'arabinose, la raffinose, la dulcite, la dextrine, la mannite, la maltose, la saccharose, la galactose et la lactose; il est sans action sur la glycérine, la dulcite et l'érythrite.

Le second groupe comprend deux échantillons isolés des eaux par M. Grimbert. Ils font fermenter les mêmes sucres que les échantillons du premier groupe et de plus la glycérine; la dulcite et l'érythrite ne sont point attaquées.

Dans le troisième groupe M. Grimbert fait rentrer les bacilles

de Friedländer qui font fermenter tous les sucres y compris la dulcite, à l'exception de l'érythrile. — Ce groupe comprend un échantillon provenant de l'Institut Pasteur, étudié par M. Grimbert, et deux échantillons isolés par lui des eaux.

M. Grimbert ne s'est point contenté dans ses expériences de noter s'il y avait fermentation ou non, il a aussi recherché quelles étaient les substances produites par ces fermentations, acides et alcool.

Nous n'avons pu, pour notre part, faire des recherches aussi complètes; nous nous sommes bornés à faire des cultures dans le milieu de M. Grimbert et parallèlement dans ce milieu légèrement modifié en remplaçant le carbonate de chaux par le tournesol.

Le dégagement de gaz et la coloration rouge du bouillon nous ont montré s'il y avait fermentation ou non.

Le tableau ci-joint donne le résultat de nos expériences. Le temps indiqué correspond non au début de la fermentation; mais au moment où celle-ci est en pleine activité. O indique l'absence de fermentation. En consultant ce tableau, on verra que les six échantillons de Friedländer isolés par nous des angines peuvent être rangés en deux catégories.

Un seul échantillon F6 appartient au 1<sup>er</sup> groupe de M. Grimbert. Il est sans action sur la glycérine, la dulcite et l'érythrile. Les cinq autres font fermenter la glycérine, mais n'attaquent ni la dulcite, ni l'érythrile; ils doivent rentrer dans le second groupe de M. Grimbert. Comme particularités intéressantes, nous noterons la lenteur mise par l'échantillon F2 à faire fermenter la saccharose; cinq essais ont été faits successivement, et, dans les cinq, la fermentation ne s'est montrée active qu'au dixième jour. La fermentation de la glycérine et celle de la lactose ont demandé des temps variables. Il n'y a point parallélisme absolu entre le temps nécessaire pour la fermentation de la lactose et celui que demande la coagulation du lait: tous les échantillons ont, en fin de compte, fait fermenter la lactose, et la moitié d'entre eux n'a point coagulé le lait, même après trois passages.

ÉCHANTILLONS DR. B. DE FRIEDELANDER.		Glucose.	Arabinose.	Galactose.	Maltose.	Mannite.	Dextrose.	Raffinose.	Saccharose.	Glycérine	Lactose.	Dulcile.	Brythrite.	(cœagulation).	Last.
F 1		4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	2 j.	0	0	8 j.	
F 2		4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	40 j.	3 j.	4 j.	0	0	12 j.	
F 3		4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	0	0	6 j.	
F 4		4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	2 j.	0	0	
F 5		4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	2 j.	6 j.	0	
F 6		4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	4 j.	2 j.	4 j.	3 j.	0	0	0	

5<sup>e</sup> *Virulence.* — *Pour la souris.* — L'inoculation sous-cutanée d'une trace de culture sur sérum coagulé a amené dans tous les cas la mort avec abcès à pus filant, crèmeux au point d'inoculation, hypertrophie de la rate et généralisation du bacille dans les organes. La mort est venue en un temps variable : 18 heures (F6), 20 heures (F1), 23 heures (F2), 26 heures (F5), 36 heures (F4), 60 heures (F3).

*Pour le cobaye.* — L'inoculation a été faite sous la peau ; 1 centimètre cube de culture en bouillon de 24 heures a été inoculé à 5 cobayes. Dans trois cas, il y a eu abcès au point d'inoculation, s'ouvrant au quatrième jour, donnant issue à un pus épais, filant, riche en bacilles de Friedländer. Deux des cobayes ayant présenté ces abcès, ceux correspondant aux bacilles F4 et F5 ont guéri ; un seul, celui qui avait reçu la culture F3, est mort en 10 jours avec des lésions de broncho-pneumonie, de pleurésie pyo-hémorragique, et de la congestion des capsules surrénales, son sang et la pulpe des divers organes contenaient en abondance le bacille de Friedländer.

Les cobayes ayant reçu les cultures F1 et F2 n'ont présenté qu'une induration locale légère et sans durée. La culture F6 n'a point été expérimentée.

*Pour le lapin.* — L'inoculation a été faite dans la veine marginale de l'oreille ; 2 centimètres cubes de culture en bouillon de 24 heures ont été injectés à 5 lapins.

Trois des lapins, ceux qui avaient reçu les cultures F4, F5, et F2, moururent respectivement en 6 heures, 10 heures et 4 jours 1/2. A leur autopsie, on trouve une légère hypertrophie de la rate, un épanchement pleural et péritonéal peu abondant et le bacille de Friedländer généralisé dans tous les organes. Nous n'avons point noté l'hypertrophie des capsules surrénales décrites dans ces cas par M. Roger. La culture F6 n'a pas été expérimentée.

6<sup>e</sup> *Essai de reproduction des fausses membranes.* — Nous avons fait plusieurs tentatives pour reproduire des fausses membranes chez les animaux avec des cultures pures de bacilles de Friedländer. Nos expériences ont porté sur le lapin, le cobaye et le pigeon ; elles ont donné des résultats inconstants. Tandis que par scarification de la peau de l'oreille et par excoriation de la

muqueuse conjonctivale chez le lapin, de la muqueuse vulvaire chez le cobaye, nous n'avons rien obtenu, l'excoriation de la muqueuse vulvaire de la lapine nous a donné dans un cas de la tuméfaction des grandes lèvres, et un exsudat blanc qui eut une durée de cinq jours. Cet exsudat contenait le bacille de Friedlænder en abondance.

Chez le pigeon, en excoriant la muqueuse du plancher de la bouche et du pharynx, nous avons obtenu un très léger exsudat qui dura 3 jours, mais dans lequel il ne nous fut point possible de déceler la présence du bacille de Friedlænder.

Ces essais devront évidemment être repris. Les résultats non concordants auxquels ils nous ont conduits n'ont rien qui doive surprendre: tout le monde sait combien il est difficile de produire expérimentalement des fausses membranes avec des cultures pures, qu'il s'agisse du bacille de Friedlænder, du bacille diphtérique, ou du streptocoque.

### III

#### RÉSUMÉ DES OBSERVATIONS CLINIQUES

##### 1<sup>o</sup> Angines à bacille de Friedlænder pur.

OBSERVATION I. — Jeune fille de 20 ans. Examinée le 2 décembre 1895, par M. le Dr Gargam, pour un enrouement léger. A l'examen de la gorge on constate sur les amygdales et sur le pilier postérieur droit de petits points blancs, de 3 à 6 millimètres de diamètre, très adhérents.

Aucun symptôme général. Le 4 décembre l'enrouement a disparu, la gorge est dans le même état. Les jours suivants, il y a augmentation d'épaisseur de l'exsudat.

La malade, revue en mai 1896, était exactement dans le même état. En septembre seulement elle a été guérie par les cautérisations au galvanocautére.

L'examen bactériologique, fait en décembre et en mai, donna sur sérum coagulé des colonies abondantes de bacille de Friedlænder et de rares colonies de cocci.

OBSERVATION II. — Fillette de 9 ans, vue par M. le Dr Delabost, le 12 janvier 1896. Elle présente sur les deux amygdales un léger exsudat gris jaunâtre, très adhérent, mais dont il est facile de désagrèger les couches superficielles. Aucun symptôme général ou fonctionnel. En juillet 1896 la malade est dans le même état.

Trois examens bactériologiques, faits en janvier et juillet, ont donné sur sérum des colonies abondantes de bacille de Friedlænder et de rares colonies de cocci; à l'examen direct : leptothrax nombreux.

OBSERVATION III. — Jeune homme de 29 ans, vu par nous le 7 juin : aucun symptôme général ou fonctionnel. La gorge, examinée par hasard, montre quelques points blancs identiques à ceux décrits dans l'observation I, sur les amygdales et les piliers postérieurs. A l'examen bactériologique : nombreuses colonies de bacille de Friedländer sur sérum et quelques colonies de pneumocoque, non virulent pour la souris blanche.

OBSERVATION IV. — Femme de 35 ans, vue par le Dr Gargam et l'un de nous. L'affection a débuté par une éruption d'aphtes le 7 juillet. On constate encore, à l'examen pratiqué alors, de petites ulcérations de la langue et de la face interne des joues. Les amygdales sont grosses, couvertes de points blanc nacré, très adhérents, à bords nets, s'enfonçant dans les cryptes amygdaliennes, faciles à désagréger dans leurs parties superficielles.

Il existe des points semblables sur le pilier gauche et sur la paroi postérieure du pharynx. Pas de phénomènes généraux, sauf au début, au moment de la poussée aphteuse.

Le 20 juillet, jour où nous la voyons, l'état de la gorge est stationnaire. A l'examen bactériologique, colonies abondantes de bacille de Friedländer et rares colonies de cocci, sur sérum, leptothrix nombreux sur les frottis.

OBSERVATION V. — Jeune fille de 16 ans, du service du Dr Ballay (hospice général), examinée par nous le 15 mars 1896. Elle a présenté, il y a 15 jours, une céphalalgie légère avec insomnie et courbature. Actuellement il n'existe pas de phénomènes généraux. La gorge est examinée par hasard. Les amygdales sont hypertrophiées, les cryptes profondes sont couvertes de fausses membranes adhérentes. Le 19 mars survient un érythème généralisé, formé de plaques non saillantes, prédominant aux membres, épargnant la face et les mains. L'érythème eut une durée de 10 jours, l'état de la gorge resta stationnaire. Le 10<sup>e</sup> avril il n'y avait aucun changement local. L'enfant revue en septembre était guérie de son angine.

L'examen bactériologique fait en mars montra la présence sur sérum de colonies nombreuses de bacille de Friedländer et de rares colonies de cocci.

Au mois de septembre l'ensemencement donna un résultat négatif.

OBSERVATION V bis. — (Max Stooss, *loco cit.*) Femme de 30 ans, vue le 7 février 1893, pour une affection pharyngée datant de 8 jours. Pas de signes généraux. Dépôt blanc jaunâtre sur l'amygdale droite, s'étendant un peu sur le pilier correspondant, plaque de moindre importance sur l'amygdale gauche.

L'angine guérit en 3 jours.

L'examen bactériologique direct montra la présence de bacille de Friedländer, de cocci et de leptothrix.

Les ensemencements faits sur gélose donnèrent lieu au développement de colonies nombreuses de bacille de Friedländer, de quelques colonies de cocci, et de rares colonies de streptocoques. La culture du bacille de Friedländer, inoculée à une souris, amena sa mort en 3 jours avec abcès au point d'inoculation, hypertrophie de la rate et présence du microbe dans tous les organes.

*2<sup>e</sup> Angine à bacille diphtérique et bacille de Friedlænder associés.*

OBSERVATION VI. — Jeune femme, 22 ans, sujette aux angines dans l'enfance et ayant de grosses amygdales. Le 16 novembre 1896 au soir, frissons et malaise général peu intense.

Le lendemain mal de gorge léger; apparition d'un point blanc sur l'amygdale gauche. Le 18 au matin la luette est extrêmement œdématisée, mais sans fausses membranes, les deux amygdales présentent des points blancs non confluents qui paraissent d'épaisseur très faible et sans grande adhérence aux parties profondes, la température n'atteint pas 38°. L'ensemencement sur sérum coagulé fait la veille ayant donné des colonies de bacille diphtérique et de bacille de Friedlænder, 20 c. c. sont inoculés. Le soir la température est à 38°,4, le pouls à 112; il n'y a point d'albumine, la douleur à la déglutition est vive.

Le 19, la luette est envahie par deux plaques blanches occupant les bords et se réunissant au sommet de l'organe; les fausses membranes ont plutôt diminué un peu sur l'amygdale gauche, elles sont plus confluentes à droite. Partout elles sont adhérentes, et la muqueuse saigne au moindre attouchement: la température ne dépasse pas 37°,5, le pouls 90. Le 20, diminution de l'œdème de la luette, état stationnaire des fausses membranes, le mal de gorge est moindre, pas de phénomènes généraux.

Les jours suivants l'état local fut stationnaire, les fausses membranes diminuèrent peu à peu d'étendue, abandonnant successivement l'amygdale gauche, la droite et la luette; la douleur de gorge s'atténua, il n'y eut aucun symptôme général. Durant toute la durée de l'angine, il y eut conservation de l'appétit. Le 24 novembre seulement les fausses membranes disparurent.

Après la guérison de l'angine, le bacille diphtérique et le bacille de Friedlænder persistèrent dans la gorge jusqu'au 7 décembre; à cette date les ensemencements sur sérum coagulé ne donnèrent plus lieu au développement de colonies de ces deux microbes.

Rouen, décembre 1896.

# NOTE SUR UN ÉCHANTILLON DE BACILLE DE FRIEDLÄNDER ISOLE DE LA VASE DE LA SEINE

PAR MM. C. NICOLLE ET A. HÉBERT.

Le hasard nous a fait rencontrer dans un échantillon de vase de la Seine (Grand-Couronne) une variété de bacille de Friedländer qu'il est peut-être intéressant de rapprocher des spécimens isolés par nous des angines, et de ceux étudiés par M. Grimbert.

Au point de vue morphologique, ce microbe est identique aux variétés précédemment décrites ; cependant il est un peu moins polymorphe et ne présente point de formes filamenteuses.

En bouillon, gélatine, gélose, serum coagulé, caractères ordinaires. Sur pomme de terre, développement abondant et dégagement de bulles de gaz ; sur carotte, développement faible sans fermentation. Le lait cultive bien, la coagulation commence au 8<sup>e</sup> jour. Pas d'indol.

En 24 heures, dans le milieu de M. Grimbert, la fermentation des sucres suivants est déjà très active : glucose, arabinose, galactose, maltose, mannite, raffinose, saccharose, lactose et glycérine ; la dextrine fermente un peu plus tardivement.

La dulcite et l'érythrite ne sont point attaquées.

Cet échantillon rentre donc, au point de vue des fermentations, dans la seconde classe de M. Grimbert, il se rapproche par ces caractères des cinq premiers échantillons isolés par nous des angines. Il s'en distingue parce qu'il est inoffensif pour la souris adulte ; 2 c. c. d'une culture de 24 heures en bouillon inoculés sous la peau ne lui donnent point le moindre malaise. Par contre, une souris de quelques jours inoculée, est morte en 48 heures avec les lésions classiques (abcès local et généralisation du microbe).

Rouen, décembre 1896.

# SUR LA PESTE BUBONIQUE (SÉRO-THÉRAPIE)

PAR LE Dr A. YERSIN

Médecin de première classe des colonies, Directeur de l'Institut Pasteur de Nha-Trang (Annam).

La peste bubonique a disparu de l'Europe, mais elle sévit encore dans certains pays de l'Asie, notamment en Chine, où depuis l'année 1871 elle s'est installée dans le Yunam. Chaque année, du mois de mars au mois de juillet, elle fait de nombreuses victimes dans cette province. L'épidémie est annoncée par une maladie des rats qui sortent par bandes, courant affolés dans les maisons et meurent en grand nombre. Après les rats les animaux domestiques sont atteints, puis les hommes<sup>1</sup>. En 1882, la peste se montra à Pakhoï, mais elle restait inconnue à Canton. Elle y apparut pour la première fois en mars 1894. Sans doute, elle venait de Pakhoï d'où elle n'avait jamais complètement disparu. Des familles de Canton émigrées à Hong-Kong apportèrent la maladie.

C'est pendant l'épidémie de Hong-Kong que j'entrepris, sur la peste, des recherches bactériologiques dont les résultats ont été publiés dans ces *Annales* en septembre 1894<sup>2</sup>. Rappelons-les brièvement : chez les malades de la peste, on trouve constamment un microbe spécifique, très abondant dans les bubons. Dans les cas graves, il passe dans le sang, et à l'autopsie on le rencontre dans les ganglions lymphatiques, dans le foie et dans la rate. Ce microbe, qu'il est facile de mettre en évidence en colorant la pulpe du hubon par les couleurs basiques d'aniline, apparaît, au microscope, sous la forme d'un bacille court à bouts arrondis, se teignant plus fortement aux extrémités. C'est un cocco-bacille qui se décolore par le procédé de Gram. Il cultive

1. Relation de M. Rocher, rapportée par le Dr Louis Pichon. *Un voyage au Yunam*. Paris 1893.

2. *Comptes rendus Acad. des Sc.*, juillet 1894.

facilement sur la gélose et dans le bouillon alcalin, où il se dispose en chapelets de courts bacilles.

Le microbe existe non seulement chez l'homme atteint de peste, mais aussi chez les rats qui meurent en si grand nombre au début de l'épidémie. Souvent, ces animaux pestiférés présentent de gros ganglions, véritables bubons remplis de bacilles spécifiques. Avec les cultures pures, provenant de peste humaine, il est facile de reproduire la maladie sur le rat et sur la souris en les inoculant au moyen d'une piqûre. L'animal infecté meurt en 40-60 heures; les ganglions de la région inoculée sont très augmentés de volume et entourés d'un tissu œdématisé; ceux des autres régions sont tuméfiés et renferment des bacilles en abondance, ainsi que la rate et le foie. Un rat prend encore la maladie si on lui fait ingérer une culture du bacille de la peste, il peut alors contaminer d'autres rats sains placés dans la même cage. Voici qu'en partant d'une culture pure, nous faisons naître une épidémie qui ne diffère des épidémies spontanées que parce qu'elle reste limitée à une cage au lieu de s'étendre à toute une cité.

Au moment des épidémies de peste, et même après que la maladie a disparu, on trouve, dans le sol des localités infectées, un microbe exactement semblable à celui de la peste, mais moins virulent que celui retiré des bubons.

Ce microbe se conserve dans la terre, et on conçoit que les rats puissent se contaminer si les circonstances sont favorables. C'est ainsi que se réveillent les épidémies. Avec une prescience surprenante, M. Pasteur, dans son célèbre mémoire sur l'atténuation des virus et leur retour à la virulence, écrivait à propos de l'apparition spontanée de la peste à Benghazi en 1856 et en 1858 : « Supposons, guidés comme nous le sommes par tous les faits que nous connaissons aujourd'hui, que la peste, maladie virulente propre à certains pays, ait des germes de longue durée. Dans tous ces pays, son virus atténué doit exister, prêt à reprendre sa forme active quand des conditions de climat, de famine, de misère s'y montrent de nouveau<sup>1</sup>. »

L'expérience a confirmé entièrement les idées de M. Pasteur.

Cette étiologie nous explique pourquoi la peste sévit avec tant d'intensité dans les pays comme la Chine, où les familles

1. PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX. Académie des Sciences. Févr. 1881.

vivent entassées, sur un sol souillé de détritus de toute sorte, visité par les rats<sup>1</sup>. La peste, qui est d'abord une maladie du rat<sup>2</sup>, devient bientôt une maladie de l'homme. Il n'est pas déraisonnable de penser qu'une bonne mesure prophylactique contre la peste serait la destruction des rats. J'ai vu aussi à Hong-Kong que les mouches peuvent transporter le virus, et j'ai pu donner la peste à des cobayes, en leur injectant un peu d'eau stérilisée dans laquelle j'avais broyé des mouches trouvées mortes au laboratoire.

L'homme prend la maladie comme les animaux, soit par des plaies de la peau, soit par le tube digestif. Le bacille de la peste a été signalé dans les déjections, et d'ailleurs les symptômes d'entérite ne sont pas rares chez les pestiférés. Parfois, les malades n'ont aucune glande apparente, mais à l'autopsie on découvre une tuméfaction des ganglions mésentériques qui constituent des bubons internes<sup>3</sup>. Tous ces détails sont importants à connaître si on veut se rendre compte de la façon dont la maladie se répand, et prendre les mesures propres à l'arrêter.

Après avoir observé la peste à Hong-Kong en 1894, je rentrai à Paris pour faire, à l'Institut Pasteur, une étude plus détaillée du bacille, et surtout pour essayer d'immuniser des animaux. Sous la direction de M. Roux, MM. Calmette et Borrel avaient déjà entrepris l'immunisation des lapins et des cobayes : le terrain était donc préparé.

L'injection d'une culture récente de peste (un quart de culture sur gélose) sous la peau d'un cheval provoque une tuméfaction considérable, accompagnée d'une fièvre violente pendant

1. Dans son rapport sur l'épidémie de Canton en 1894, le Dr Rennie, médecin des douanes chinoises, fait remarquer que parmi les Cantonais habitant des bateaux sur le fleuve, il n'y a pas eu de malades, si ce n'est ceux qui ont été apportés de la terre. Beaucoup de gens aisés ayant observé le fait ont quitté leurs maisons pour venir habiter dans les bateaux.

2. Dans le même rapport, le Dr Rennie raconte que le seul gardien de la porte de l'Ouest à Canton fit ramasser 22,000 rats crevés qu'il enterra en dehors de la ville.

3. Le Dr Wilm, de la Marine allemande, chargé de faire des recherches sur la peste de Hong-Kong, durant l'épidémie de 1895, a trouvé le bacille de la peste dans les crachats de 11 pestiférés sur 12 examinés qui présentaient des signes de bronchite. Deux fois il l'a rencontré dans l'enduit de la langue. Chez 45 malades qui avaient des symptômes d'entérite, sans bubons apparents, le bacille existait dans les selles. Le Dr Wilm signale que, pendant le cours de ses expériences, deux singes et quatre cochons d'Inde moururent de peste spontanée, sans avoir été inoculés expérimentalement. (Dr Wilm, *Rapport sur la peste*. Hong-Kong, 20 mai 1896.)

48 à 60 heures ; puis, le gonflement diminue et se précise pour aboutir à un abcès. Afin d'éviter la suppuration, l'inoculation a été faite dans les veines, en prenant toutes les précautions pour éviter les embolies. Déjà, 4 à 6 heures après l'injection, la température atteint 40° et s'élève parfois à 41° 5. Le cheval est abattu, frissonnant. La fièvre se maintient pendant plusieurs jours, elle baisse graduellement sans qu'on remarque aucune tuméfaction ganglionnaire. Les injections sont répétées avec des doses plus fortes, mais à intervalles assez éloignés, afin que l'animal se rétablisse complètement après chacune d'elles. Souvent, en effet, il survient des gonflements articulaires, des synovites qui ne suppurent point, mais amènent des boiteries douloureuses. Pendant l'immunisation, les chevaux maigrissent beaucoup, et il faut bien se garder de trop précipiter les inoculations. Ils réagissent à chacune d'elles, si la dose est assez forte mais la durée de la réaction devient de plus en plus courte.

Le premier cheval, ainsi immunisé, fut saigné 3 semaines après la dernière injection, et son sérum fut essayé sur des souris. Ces petits rongeurs meurent toujours lorsqu'on leur inocule le bacille virulent de la peste, et en faisant des passages de souris à souris on entretient un virus très actif. Les souris qui recevaient 1/10 de c. c. du sérum de cheval immunisé ne devenaient point malades quand, 12 heures après, elles étaient infectées avec de la peste. Ce sérum était donc préventif. Nous avions constaté, avant de commencer l'immunisation, que le sérum de notre cheval et aussi celui d'autres animaux neufs, lapins, cobayes, n'avait aucune action préventive. Pour guérir les souris, déjà inoculées de la peste depuis 12 heures, il fallait employer un c. c. à un c. c. et demi de sérum. Les petits rongeurs traités avec ces doses guérissaient constamment, tandis que les témoins mouraient. Le sérum avait donc des propriétés curatives manifestes. Ces premières expériences de séro-thérapie ont été publiées dans ces *Annales* en juillet 1895<sup>1</sup>, elles étaient assez encourageantes pour être poursuivies, et elles faisaient espérer que la séro-thérapie pourrait être appliquée à l'homme pestiféré.

Aussi, à mon retour en Indo-Chine, grâce au concours de

1. *La peste bubonique*, par MM. YERSIN, CALMETTE et BORREL.

M. le Gouverneur général et du Ministère des Colonies<sup>1</sup>, j'installai à Nha-Trang (Annam), à proximité des régions où la peste sévit le plus, un laboratoire pour la préparation des virus, et des écuries pour loger les chevaux immunisés. Cette installation constitue l'*Institut Pasteur de Nha-Trang*. Elle était loin d'être terminée lorsque la peste se réveilla à Hong-Kong en janvier 1896. A cette époque, malgré que M. Pesas, vétérinaire militaire attaché à l'*Institut de Nha-Trang*, et moi, nous ayons fait toute la diligence possible, nous n'avions aucun animal suffisamment immunisé. Je dus attendre jusqu'au 10 juin pour me rendre à Hong-Kong muni de quelques flacons de sérum fourni par une des juments de Nha-Trang. Cette petite quantité de sérum ne m'aurait pas permis d'entreprendre des expériences décisives, lorsque je reçus de l'*Institut Pasteur de Paris* 80 flacons de sérum anti-pesteux provenant du cheval immunisé qu'on y entretenait.

Le 20 juin, il n'y avait plus de peste à l'hôpital de Kennedytown : les 3 ou 4 décès survenant chaque jour à Hong-Kong avaient tous lieu dans des maisons chinoises où assurément, mon sérum et moi aurions été mal accueillis. Je me rendis à Canton : l'épidémie y était à sa fin ; d'ailleurs, malgré l'appui empressé du consul de France, M. Flayelle, il paraissait bien difficile d'essayer le sérum sur quelque Chinois pestiféré, car la population de Canton passe pour la plus turbulente de la Chine et la plus hostile aux étrangers. Un hasard heureux me fit rencontrer le malade cherché et dans des conditions inespérées pour une tentative thérapeutique. Au cours d'une visite que je lui faisais, Mgr Chausse, évêque de la Mission catholique, me demanda si je connaissais un remède contre la peste.

— Nous en aurions bien besoin, ajouta-t-il, car un jeune Chinois de la mission est gravement atteint de cette maladie.

— J'ai un remède, répondis-je à l'évêque, je le crois excellent, mais je ne l'ai jamais essayé sur un malade.

Mgr Chausse, qui considérait le jeune Chinois comme perdu, me conduisit près de lui et me donna toute facilité d'expérimenter le sérum, prenant sur lui toutes les responsabilités

1. Je dois ici mes remerciements particuliers à M. le Dr Treille, inspecteur général du Service de santé des Colonies, pour l'appui qu'il n'a cessé de me donner.

si la tentative ne réussissait pas. Voici l'observation de ce premier cas de peste traité par le sérum :

Tsé, jeune Chinois de 18 ans, élève du séminaire et y remplissant les fonctions d'infirmier, était mal à l'aise depuis quelques jours (fatigue, maux de tête), lorsque le 26 juin, à 10 heures du matin, il se plaint d'une vive douleur à l'aine droite; à midi, la fièvre se déclare subitement et le malade doit s'aliter. Mgr Chausse me conduit près de lui à 3 heures de l'après-midi. Le jeune Chinois est somnolent, il ne peut se tenir debout sans vertige, il éprouve une lassitude extrême, la fièvre est forte, la langue chargée. Dans l'aine droite existe un empâtement très douloureux au toucher. Nous avons bien devant nous un cas de peste confirmé, et la violence des premiers symptômes peut le faire classer parmi les cas graves.

A 5 heures (6 heures après le début de la maladie), je pratique une injection de 10 c. c. de sérum. A ce moment, le malade a des vomissements et du délire, signes très alarmants et qui montrent la marche rapide de l'infection. A 6 heures et à 9 heures du soir, nouvelles injections de 10 c. c. chacune. De 9 heures à minuit, aucun changement dans l'état du malade qui reste somnolent, s'agit et se plaint souvent. La fièvre est toujours très forte et il y a un peu de diarrhée. A partir de minuit, le malade devient plus calme, et, à 6 heures du matin, au moment où le Père directeur vient prendre des nouvelles du pestiféré, celui-ci se réveille et dit qu'il se sent guéri. La fièvre, en effet, est complètement tombée, la lassitude et les autres symptômes graves ont disparu; la région de l'aine n'est plus douloureuse au toucher et l'empâtement presque effacé. La guérison est si rapide que si plusieurs personnes autorisées n'avaient, comme moi, vu le patient la veille, j'en arriverais presque à douter d'avoir traité un véritable cas de peste.

On comprendra que cette nuit passée près de mon premier pestiféré ait été pour moi pleine d'anxiété. Mais, au matin, lorsque avec le jour parut le succès, tout fut oublié, même la fatigue.

30 c. c. de sérum avaient suffi à guérir, avec une rapidité surprenante, un cas de peste grave. Cependant, ce sérum n'était pas très actif, il venait d'une jument de Nha-Trang, et il n'en fallait pas moins de un quinzième à un vingtième de c. c. pour

préserver une souris de 20 grammes contre une dose de culture mortelle en 24-364 ; si bien que je fus surpris, tout le premier, d'un succès si facile. A tout prix je devais me procurer d'autres pestiférés.

Je restai encore deux jours à Canton, pour suivre mon malade : la convalescence s'affirmait, les forces revenaient avec l'appétit et je pus partir pleinement rassuré, en laissant au Consulat de France une seringue et quelques flacons de sérum, pour le cas où de nouveaux malades seraient observés au Séminaire. Ce sérum ne tarda pas à être employé, et je citerai textuellement ce que Mgr Chausse écrivait à M. Flayelle :

« M. Yersin est un médecin prévoyant. En guérissant le jeune séminariste, il a montré la valeur de son remède ; en nous laissant une seringue et quelques flacons de sérum, il nous a épargné beaucoup d'ennuis. Deux nouveaux cas se sont déclarés dans la même maison ; l'un, dimanche, l'autre hier lundi. On a injecté la liqueur et aujourd'hui les deux élèves sont sur pied, les bubons ne sont plus douloureux, la fièvre est à peu près tombée. »

Le 1<sup>er</sup> juillet, je me dirigeai sur Amoy où, d'après les journaux, la peste faisait encore de nombreuses victimes. Amoy est une ville de deux cents à trois cent mille habitants, dont le port est fréquenté par de nombreux vapeurs venant surtout de Singapour, de Manille, de Shanghai et de Hong-Kong. La peste a été importée de cette dernière ville, l'année dernière, et depuis lors elle a régné à Amoy presque sans interruption, avec une accalmie pendant les mois d'hiver où les cas étaient rares. La population européenne (Anglais, Allemands, Américains) habite dans une île rocallieuse séparée de la ville chinoise par la rade, elle a été épargnée. Dans la ville chinoise existe un hôpital créé par le concours philanthropique des Européens et des Chinois d'Amoy. Un médecin anglais visite souvent cet établissement, qui est d'ailleurs dirigé et servi par des médecins chinois. C'est dans un pavillon abandonné de cet hôpital que je pus m'installer afin d'être plus à la portée des patients. La population d'Amoy est beaucoup moins hostile aux Européens que celle de Canton, et ne refuse pas les soins des médecins étrangers si mal vus des Cantonais. C'est ce qui explique qu'en dix jours j'ai soigné 23 cas de peste. Presque tous ces pestiférés ont été traités dans des maisons chinoises. Du matin au soir, on venait

me chercher pour voir de nouveaux malades, et on arrêtait ma chaise à porteurs, dans la rue, pour me faire entrer dans quelque maison dont un habitant venait d'être atteint par le mal.

De ces pestiférés, traités par la séro-thérapie, deux sont morts et vingt et un ont guéri. Les deux qui ont succombé étaient arrivés au 5<sup>e</sup> jour de la maladie quand le traitement a été entrepris; l'un est mort 5 heures et l'autre 24 heures après la première injection de sérum.

Voici le résumé des résultats obtenus à Amoy.

6 pestiférés étaient au premier jour de la maladie; la guérison a été obtenue chez tous en 12 à 24 heures, sans suppuration du bubon, par l'injection de 20 c. c. à 30 c. c. de sérum.

6 étaient au deuxième jour. La guérison a été plus lente et pour l'obtenir j'ai dû injecter de 30 à 50 c. c. de sérum : elle était complète en 3 à 4 jours, sans suppuration du bubon.

4 étaient au 3<sup>e</sup> jour; la fièvre a persisté 1 à 2 jours après le début des injections; la guérison a été plus lente et les bubons ont suppuré dans deux cas (sérum injecté de 40 c. c. à 60 c. c.).

3 étaient au 4<sup>e</sup> jour; ils ont guéri en 5 à 6 jours, un seul bubon a suppuré (sérum injecté de 20 c. c. à 50 c. c.).

4 étaient au 5<sup>e</sup> jour; deux sont morts dont l'état était désespéré au moment du traitement, les deux autres ont guéri (sérum injecté de 60 c. c. à 90 c. c.).

Ces 23 malades comprenaient : 6 jeunes garçons, 3 jeunes filles, 8 hommes, 4 femmes, 1 vieillard homme, 1 vieillard femme.

Jusqu'à présent, 26 pestiférés ont été traités par le sérum (3 à Canton, 23 à Amoy); ils ont fourni deux morts, soit une mortalité de 7,6 0/0.

Vingt-six cas, c'est peu assurément pour établir qu'un remède est spécifique et efficace : j'en conviens facilement et je suis le premier à déclarer qu'il faut de nouvelles expériences. Mais, si l'on considère que la peste est la plus meurtrière des maladies humaines, on conviendra que nos 26 observations prennent une valeur singulière. Tous ceux qui ont observé la peste estiment que la mortalité qu'elle cause n'est pas inférieure à 80 0/0, et comme de plus les patients que j'ai traités offraient pour la plupart des symptômes alarmants, il n'est guère à craindre que les résultats obtenus soient démentis dans la suite.

En général, la peste n'est pas une maladie qui dure ; la mort survient souvent en 3 à 4 jours : il faut donc se hâter d'intervenir. Elle est d'autant plus facile à guérir que le sérum est injecté plus tôt. On est vraiment étonné de voir se dissiper, en quelques heures, les symptômes les plus alarmants, lorsque le sérum est donné dans les deux premiers jours de la maladie. Les bubons se résolvent pour ainsi dire à vue d'œil. Si l'intervention est plus tardive, il faut davantage de sérum et on ne parvient pas toujours à éviter la suppuration des bubons, mais celle-ci, au lieu de se prolonger, comme dans le cas où la peste guérit spontanément, se tarit en quelques jours. Une preuve de l'efficacité du sérum, c'est le rétablissement complet et rapide des personnes traitées, tandis que, d'ordinaire, la convalescence est longue et pénible même pour les patients atteints de peste bénigne. Le sérum est impuissant lorsque la maladie est trop avancée. Dès que le pouls et la respiration deviennent irréguliers, que le cœur s'affaiblit, l'empoisonnement est trop avancé et le sérum ne peut rien.

Le sérum employé à Amoy m'avait été envoyé de l'Institut Pasteur de Paris, il était préventif à la dose de 1/10 de c. c., pour une souris de 20 grammes. Il avait été expédié d'abord à Nha-Trang, d'où je l'avais transporté à Hong-Kong, puis à Canton, puis à Amoy. Malgré tous ces voyages pendant la saison chaude, il avait conservé ses propriétés curatives. C'est là un fait intéressant, qui démontre que le sérum anti-pesteux pourra être expédié au loin.

Il va sans dire que les sérum qui nous ont servi étaient bien loin de posséder toute l'activité qu'on peut obtenir. Ils étaient même très faibles, si on les compare aux sérum anti-diphétique et anti-tétanique : il faut donc s'efforcer d'en préparer de beaucoup plus actifs qui agiront mieux encore et à plus faible dose. D'ailleurs, dans bien des cas, j'ai donné plus de sérum qu'il n'était nécessaire, et j'ai pratiqué des injections à des convalescents dans le seul but de précipiter une guérison déjà assurée.

Les patients se sont plaints, quelquefois, de douleurs assez vives au point d'injection, mais celles-ci se dissipent promptement, et aucun accident de quelque importance ne peut être attribué au sérum.

Le diagnostic bactériologique n'a pas été fait dans tous les

cas traités. Je n'avais pas le loisir d'ensemencer des tubes de gélose et de regarder au microscope; cependant, j'ai constaté le bacille spécifique dans plusieurs bubons.

La peste est une maladie assez facile à reconnaître, pour que cette omission enlève beaucoup de leur valeur aux observations que j'ai rapportées.

Le sérum anti-pesteux a-t-il des propriétés anti-toxiques, ou est-il seulement efficace contre le microbe? La réponse à cette question suppose la connaissance de la toxine de la peste. Celle-ci existe, j'ai pu la retirer des cultures, et je me propose d'en faire plus tard l'étude; mais, actuellement, la peste est trop menaçante pour songer à autre chose qu'à préparer du sérum, sans pénétrer le mécanisme de son action.

Jusqu'ici, le sérum anti-pesteux n'a été employé que dans le cas de maladie confirmée. D'après ce qui a été observé chez les animaux, il doit être plus efficace encore pour prévenir la peste que pour la guérir. Il est donc tout indiqué, lorsqu'un cas de peste a éclaté dans une maison, d'injecter préventivement du sérum à toutes les personnes exposées à la contagion. Je pense que c'est la mesure la plus efficace contre la diffusion de la maladie. Combien de temps durerait l'immunité ainsi conférée? Des expériences en train sur les animaux l'établiront. Mais je me promets bien d'essayer ces injections préventives lorsque je serai muni d'une assez grande quantité de sérum pour entreprendre une nouvelle campagne.

## APPENDICE

---

Je donne ici un court résumé des vingt-trois cas de peste traités à Amoy.

CAS N° I. — *Ho*, 21 ans, pris le 7 juillet à midi. Accablement, fièvre, vertiges. Petit bubon très douloureux à la région crurale droite. — A sept heures du soir, injection de 20 c. c. sérum de Nha-Trang et 20 c. c. sérum de Paris.

8 juillet. — 8 h. du matin : fièvre disparue, bubon presque dissipé, plus du tout douloureux. Les piqûres de sérum font encore mal.

9 juillet. — Plus de trace du bubon, le malade mange avec appétit et reprend rapidement ses forces.

CAS N° II. — Chinois âgé de 32 ans, malade depuis 2 jours, gros bubon crural à droite, très douloureux au toucher, fièvre, pouls : 120 à la minute. Accablement, somnolence. A 3 h. 30, le 6 juillet, injection de 60 c. c. sérum de Paris.

*7 juillet.* — 6 heures du matin. La nuit a été bonne, peau moite, pouls 94. Bubon bien limité, encore douloureux. Injection de 40 c. c. de sérum.

*8 juillet.* — Le malade va de mieux en mieux. Plus de fièvre, plus d'accablement. Le bubon est encore douloureux et contient du pus.

CAS N° III. — *Sin Ouah*, garçon de 10 ans, malade depuis 3 jours. Bubon crural gauche, douloureux, forte fièvre.

*8 juillet.* — A 9 heures du soir injection de 20 c. c. sérum de Paris.

*9 juillet.* — Grande amélioration, plus de fièvre, plus de céphalalgie, le bubon n'est plus douloureux, l'enfant est gai et éveillé. Ses parents lui donnent beaucoup à manger. A dix heures la fièvre reprend assez forte. Injection de 10 c. c. sérum. A trois heures du soir, langue saburrale, gargouillements dans le ventre qui est douloureux. Je pense à une fièvre typhoïde. Je fais prendre de l'huile de ricin.

*10 juillet.* — Fièvre continue, le ventre est douloureux, gargouillements. A 2 heures du soir, injection de 20 c. c. de sérum Nha-Trang. Le bubon n'est plus douloureux et a beaucoup diminué.

*11 juillet.* — La maladie ressemble de plus en plus à une fièvre typhoïde ; prise de naphtol et de magnésie.

*12 juillet.* — Bubon totalement disparu. La fièvre typhoïde suit sa marche normale.

CAS N° IV. — Femme chinoise, 54 ans, est malade depuis 3 jours.

*8 juillet.* — Gros bubon crural gauche, fièvre, abattement. Injection. A 2 heures du soir de 40 c. c. sérum de Paris.

*10 juillet.* — Plus de fièvre, bubon limité, moins douloureux.

*11 juillet.* — Bubon très réduit. Etat général satisfaisant.

*12 juillet.* — Bubon disparu. Bon état général.

CAS N° V. — Femme chinoise âgée de 35 ans, malade depuis 2 jours.

*8 juillet.* — Forte fièvre, abattement, céphalalgie, bubon crural droit à 10 heures du matin, injection 40 c. c. sérum de Paris ; 6 heures du soir, mieux notable, fièvre tombée, moins de faiblesse ; bubon moins douloureux.

*10 juillet.* — Ni fièvre, ni abattement, bubon presque disparu, encore un peu de faiblesse, sans quoi la guérison serait complète.

CAS N° VI. — *Yong*, femme chinoise, 45 ans, malade depuis 2 jours.

*8 juillet.* — Bubon axillaire gauche très douloureux, forte fièvre, pouls 130, vomissements, accablement. A 8 heures du soir, injection 40 c. c. sérum de Paris.

*9 juillet.* — 6 heures du matin, fièvre diminuée, pouls, 96 ; plus de céphalalgie, bubon encore douloureux. Injection de 60 c. c. sérum de Paris.

*10 juillet.* — Fièvre disparue ainsi que l'abattement. Bubon bien limité, douloureux encore, va suppurer.

*12 juillet.* — Petit accès de fièvre. Injection de 35 c. c. de sérum. A guéri.

CAS N° VII. — *Koun*, garçon chinois, âgé de 10 ans, malade depuis un jour.

*8 juillet.* — Bubon crural gauche, très douloureux, forte fièvre. A 10 heures du soir, injection de 30 c. c. sérum de Paris.

*9 juillet.* — Bubon moins douloureux, fièvre encore forte, céphalalgie, pouls 130, tête brûlante, yeux injectés. A 10 heures du matin, injection de 20 c. c. de sérum Paris.

*10 juillet.* — Plus de fièvre, plus de bubon, guérison complète, encore un peu de faiblesse.

CAS N° VIII. — *Théou*, garçon chinois de 18 ans, malade depuis un jour.

*8 juillet.* — Forte fièvre, bubon crural gauche, très douloureux. A 10 heures du soir, injection de 30 c. c. de sérum de Paris,

*9 juillet.* — Plus de fièvre, bubon diminué, moins douloureux.

*10 juillet.* — Guérison complète.

CAS N° IX. — Chinois de 19 ans, malade depuis 4 jours.

*6 juillet.* — 10 heures du soir, bubon crural gauche très douloureux, fièvre intense, pouls 160, délire, vomissements. Le malade est moribond. Injection de 60 c. c. sérum de Nha-Traug. Mort à 2 heures du matin.

CAS N° X. — *Tih-Chin*, Chinois de 18 ans, arrivé au 5<sup>e</sup> jour de la maladie,

*8 juillet.* — Gros bubon crural droit très douloureux, fièvre intense, pouls 150, faible intermittent, état général très mauvais. Injection de 40 c. c. sérum de Paris.

*9 juillet.* — 7 heures du matin. Pas d'amélioration, intoxication profonde, injection de 50 c. c. de sérum de Paris. 8 heures du soir. Etat désespéré, délire, 180 pulsations, je renonce à continuer le traitement. Mort dans la nuit.

CAS N° XI. — *Lia-Diou*, fillette de 15 ans, malade depuis 3 jours, l'état s'est beaucoup aggravé depuis hier.

*9 juillet.* — Bubon crural gauche. Fièvre, hébétude, langue saburrale, mal de tête. Injection de 20 c. c. sérum de Paris à 8 heures du soir.

*10 juillet.* — Plus de fièvre. Bubon presque disparu, non douloureux.

CAS N° XII. — *Thü*, garçon de 13 ans. Malade d'aujourd'hui,

*10 juillet.* — Bubon crural gauche, fièvre intense, mal de tête. Injection, à 4 heures du soir, de 20 c. c. de sérum de Paris.

*11 juillet.* — Le bubon a disparu. Plus de fièvre.

CAS N° XIII. — *Tchiou*, jeune homme de 17 ans, malade depuis 4 jours.

*10 juillet.* — Fièvre intense, langue saburrale, prostration, diarrhée. Pas de bubon visible. A 6 heures du soir, injection de 50 c. c. de sérum de Paris.

*11 juillet.* — La langue est moins chargée, la fièvre est tombée, l'accablement moindre.

*12 juillet.* — Injection de 20 c. c. sérum de Paris, pour achever de disiper la fièvre.

*13 juillet.* — Amélioration si grande que le malade peut être considéré comme guéri.

CAS N° XIV. — *Leng*, Chinois de 26 ans, en traitement à l'hôpital pour un abcès dans le dos, il y contracté la peste.

*10 juillet.* — Bubon crural droit très douloureux, forte fièvre, lassitude. Injection de 40 c. c. de sérum de Paris. 6 heures du soir, grande amélioration.

*11 juillet.* — Bubon et fièvre ont disparu.

CAS N° XV. — *Pou*, fillette de 15 ans. Malade depuis le 11 juillet.

*12 juillet.* — Etat comateux, insensibilité, yeux larmoyants, forte fièvre, pouls 140. Bubon crural à gauche, volumineux; à 10 heures du matin, injection de 50 c. c. sérum de Paris; 6 heures du soir, moins de torpeur, pouls 136, injection de 15 c. c. sérum de Paris.

13 juillet. — 8 heures du matin. Grande amélioration, la malade a toute sa connaissance, fièvre encore forte, pouls 130. Bubon moins douloureux et moins volumineux.

14 juillet. — Le mieux s'accentue, et la jeune fille guérit complètement.

CAS N° XVI. — *Déou*, femme de 29 ans; malade depuis 2 jours.

12 juillet. — Forte fièvre, vomissements, bubon crural droit, encore peu volumineux, il a apparu le 11 juillet. Lassitude extrême, toux. A 11 h. 30 du matin, injection de 50 c. c. sérum de Paris.

13 juillet. — Le bubon et la fièvre ont disparu.

CAS N° XVII. — *Eu*, femme de 38 ans. Malade depuis hier.

12 juillet. Fièvre, lassitude, bubon crural droit très douloureux. A 3 heures du soir, injection de 50 c. c. de sérum de Paris.

13 juillet. — Plus de fièvre. Bubon presque disparu.

CAS N° XVIII. — *Pine*, vieux Chinois de 72 ans, malade depuis le matin.

12 juillet. — Fièvre, bubon crural gauche très douloureux. A 7 heures du soir, injection de 50 c. c. de sérum de Paris.

13 juillet. — Plus de fièvre. Bubon presque disparu.

CAS N° XIX. — *Sieuah*, Chinois de 47 ans. Malade depuis hier,

12 juillet. — Cas très grave : fièvre intense, vomissements, état comateux. Bubon crural droit ; à 8 h. 30 injection de 50 c. c. sérum de Paris,

13 juillet. — 8 heures ; amélioration très notable. Le malade a repris toute sa connaissance ; la fièvre est encore forte, le pouls est à 130. Le bubon est diminué, mais encore douloureux. Injection de 40 c. c. de sérum de Paris.

Des nouvelles qui m'ont été envoyées de ce malade annoncent qu'il a parfaitement guéri.

CAS N° XX. — *Disah*, Chinois de 26 ans. Malade depuis le 11 juillet au soir.

12 juillet. — Fièvre, céphalgie, courbature, faiblesse, pas de bubon. A 11 heures du soir, injection de 35 c. c. de sérum de Paris.

13 juillet. — Le malade se dit guéri, plus de fièvre ni de courbature.

CAS N° XXI. — *Pouinzo*, Chinois de 28 ans. Malade depuis le 12 juillet au soir.

13 juillet. — Fièvre intense ; bubon axillaire droit. A 9 heures du matin, injection de 30 c. c. de sérum de Paris. Guérison en 2 jours.

CAS N° XXII. — *Sien-di*, Chinois de 20 ans. Malade depuis 3 jours.

13 juillet. — Fièvre intense, bubon crural droit. Injection de 30 c. c. de sérum de Paris. A guéri avec suppuration du bubon.

CAS N° XXIII. — *Thou*, garçon de 12 ans. Malade depuis le 12 juillet.

13 juillet. — Forte fièvre. Bubon crural droit. A 9 heures du matin, injection de 20 c. c. de sérum de Paris. Guérison complète en 2 jours.

J'avais épuisé ma provision de sérum, et pour échapper aux sollicitations des parents de malades pour lesquels je ne pouvais plus rien, je quittai Amoy, laissant quelques-uns de mes patients en convalescence ; tous guériront comme j'en fus informé plus tard.

## LETTRE DE M. LE D<sup>r</sup> DE CHRISTMAS

à Monsieur le Rédacteur en chef des ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

Dans le si intéressant travail de MM. Calmette et Deléarde sur l'abrine et le venin des serpents, paru dernièrement dans les *Annales*, ces auteurs attribuent la découverte du principe actif du jéquirity à MM. Kobert et Hiller (note, page 687). Ceci est une erreur. Cette substance si curieuse que nous avons nommée jéquiritine et que M. Ehrlich plus tard a baptisée abrine<sup>1</sup>, a été étudiée et isolée pour la première fois en 1883 par M. Salomonsen et moi, et notre travail (*Die Aetiologie der Jequirity Ophthalmie, Fortschritte der Medicin.*, février 1884) a paru justement dans le même numéro du journal où M. Neisser, après s'être élevé contre la prétention de M. Sattler d'avoir découvert une nouvelle maladie infectieuse, rend compte des essais infructueux de différents auteurs (Hilger, Giesman) pour isoler une substance active des graines de jéquirity. Indépendamment de nous et vers la même époque a paru une communication de MM. Bruylants et Veuneman (*Bull. de l'Ac. de méd. de Belgique*, 3<sup>e</sup> série, t. XVIII, p. 1) dans laquelle ces auteurs annoncent avoir isolé des graines une substance phlogogène, qui est sans doute identique à la nôtre.

Si je me permets de rappeler ces publications déjà lointaines sur la jéquiritine, ce n'est pas seulement pour soulever une question de priorité de peu d'importance, mais parce que notre étude sur l'étiologie de l'ophtalmie jéquiritique, ainsi qu'un autre travail paru la même année<sup>2</sup>, tous les deux si complètement oubliés aujourd'hui, renferment quelques faits de nature à intéresser les savants que ces questions occupent. C'est ainsi que nous avons indiqué la manière de se procurer la jéquiritine en état de pureté relative, en la précipitant par l'alcool des solutions aqueuses ou glycérineuses. Pour obtenir des solutions d'une grande stabilité, nous avons indiqué un procédé — l'ex-

1. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, nos 32 et 44.

2. Ueber Pseudoinfection bei Frœsche, *Fortschr. der Med.*, 1884.

trait glycérineux des graines broyées — permettant d'obtenir une solution facile à doser et inaltérable. Je possède des solutions glycérineuses qui, vieilles de deux ans, ne semblent rien avoir perdu de leur activité. Nous avions également attiré l'attention sur ce fait assez important et encore peu connu, que les solutions de jéquirity ne se laissaient pas filtrer sur la porcelaine, qui retient la totalité de la substance active, même si on filtre de grandes quantités de liquide. J'ai voulu me rendre compte si les choses se passent encore aujourd'hui comme il y a quatorze ans, et voici le résultat non équivoque de l'expérience.

Dix grammes de graines de jéquirity décortiquées et grossièrement broyées sont infusés pendant une demi-heure avec 200 grammes d'eau, et filtrés sur une petite bougie Chamberland neuve. Un centimètre cube du liquide filtré est injecté sous la peau d'une souris, et plusieurs gouttes sont instillées dans la conjonctive d'un lapin. Comme contrôle, on injecte 1 c. c. de l'infusion non filtrée sous la peau d'une autre souris, et on applique une goutte non filtrée sur la conjonctive d'un lapin. 24 heures après, la souris de contrôle est trouvée morte: l'œil du lapin est le siège d'une ophtalmie jéquiritique caractéristique, tandis que le liquide filtré n'a produit aucune trace de conjonctivite et n'a en aucune façon affecté la souris qui, malgré la forte dose reçue, est encore en bonne santé. Dans notre seconde publication (*Pseudo-infection chez la grenouille*), nous avons décrit un curieux état de cachexie chez la grenouille intoxiquée par de petites doses de jéquirity, et dans lequel la résistance du batracien envers les invasions bactériennes est à un tel point diminuée, qu'il suffit de lui inoculer une quantité minime d'un microbe quelconque, non pathogène, pour voir celui-ci se développer en masse dans le sang, la lymphe et les organes, simulant ainsi une véritable maladie infectieuse.

Pour finir, je voudrais dire un mot sur l'application du jéquirity à la thérapeutique humaine. MM. Calmette et Deléarde conseillent en cas de trachome l'application sur la conjonctive de l'infusion de jéquirity, suivie d'une injection sous-cutanée de sérum antiabrique. Cette ingénieuse méthode, qui dans les laboratoires peut donner d'excellents résultats, ne sera peut-être pas d'une application très facile dans la pratique médicale. Je

conseillerai plutôt de se servir de solutions glycérineuses, dont la toxicité est diminuée par un chauffage gradué. Il n'est en effet pas tout à fait exact, comme tous les auteurs le disent, que la toxicité de la jéquiritine est anéantie par un chauffage à 65°. Pour que cette température abolisse le principe actif des graines, il faut la prolonger pendant 30 à 40 minutes. Si le chauffage dure moins longtemps, la toxicité subit seulement une diminution, et il est possible de chauffer un instant les solutions jusqu'à 90° avant de voir disparaître complètement leur toxicité. A cette température, une goutte d'infusion injectée sous la peau d'une souris la tue encore, mais cette même dose, instillée dans la conjonctive du lapin, ne produit plus qu'une légère conjonctivite, qui guérit en quelques jours. En chauffant les solutions de 65° à 90°, on obtient donc une jéquiritine de plus en plus affaiblie et, chose importante, les solutions conservent leur degré de toxicité pendant des années. L'injection intraveineuse et graduée de ces solutions affaiblies constitue un excellent moyen pour l'immunisation des animaux de laboratoire, et il serait facile, il me semble, de trouver pour l'application thérapeutique du jéquirity le degré d'affaiblissement juste nécessaire pour obtenir l'effet thérapeutique désiré tout en évitant les effets désastreux de panophtalmie, que les oculistes ont eu si souvent à enregistrer en appliquant les infusions fraîches sur la conjonctive humaine.

Veuillez agréer, etc.

D<sup>r</sup> F. DE CHRISTMAS.

Paris, 7 janvier 1897.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

---

Sceaux. — Imprimerie Charaire et C<sup>ie</sup>.